

03062



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE  
CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTUDIO INMUNOQUIMICO DEL COMPLEJO  $BC_1$   
MITOCONDRIAL DE CORAZON DE BOVINO

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
(BIOQUIMICA)  
PRESENTA:  
BIOL. ERIKA PATRICIA RENDON HUERTA

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **I. INTRODUCCION.**

1. La cadena respiratoria mitocondrial.	1
2. El complejo III mitocondrial (Complejo $bc_1$ ).	5
2.1 Mecanismo de la transferencia de electrones en el complejo $bc_1$ mitocondrial.	6
2.2 Acción de inhibidores en el complejo $bc_1$ mitocondrial.	12
2.3 Características de las subunidades del complejo $bc_1$ mitocondrial.	14
3. Biogénesis del complejo $bc_1$ .	25
4. Estudios cristalográficos del complejo $bc_1$ .	28
5. Antecedentes.	31

## **II. OBJETIVOS.** 35

## **III. METODOLOGIA.**

1. Obtención de mitocondrias.	37
2. Purificación del complejo $bc_1$ .	37
3. Técnicas de electroforesis.	39
4. Prueba de ELISA para la caracterización de anticuerpos.	43
5. Purificación de inmunoglobulinas G.	44
6. Producción de fragmentos Fab.	44
7. Delipidación del complejo $bc_1$ .	47
8. Preparación de fosfolípidos.	47
9. Medición de la actividad del complejo $bc_1$ .	47
10. Reducción del 2,3-dimetoxi 5-metil 6-decil, 1,4-benzoquinona (DBH <sub>2</sub> ).	49
11. Caracterización espectrofotométrica del complejo $bc_1$ .	50

12. Purificación de la subunidad VIII del complejo bc <sub>1</sub> mitocondrial.	51
13. Diseño de un péptido sintético de la subunidad VIII.	52
14. Acoplamiento del péptido sintético a acarreadores.	52
15. Obtención de anticuerpos policlonales.	53
16. Inmuno-réplicas tipo Western.	54

#### IV. RESULTADOS.

1. Ausencia de inhibición por anticuerpos en el complejo bc <sub>1</sub> mitocondrial intacto.	57
2. Integridad y actividad del complejo bc <sub>1</sub> .	57
3. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc <sub>1</sub> delipidado y sin delipidar.	64
4. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc <sub>1</sub> delipidado en presencia de seis anticuerpos específicos.	64
5. Características de la actividad del complejo bc <sub>1</sub> delipidado en presencia de seis anticuerpos específicos.	70
6. Inhibición aditiva del complejo bc <sub>1</sub> delipidado	76
7. Características de la actividad del complejo bc <sub>1</sub> delipidado en presencia de anticuerpos específicos para dos péptidos sintéticos del citocromo b.	76
8. Obtención de inmunoglobulinas G puras específicas para dos subunidades del complejo bc <sub>1</sub> puro.	81
9. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc <sub>1</sub> delipidado en presencia de inmunoglobulinas G puras específicas contra de dos subunidades.	84
10. Obtención de fragmentos Fab generados a partir de dos inmunoglobulinas puras específicas para las subunidades V y VI.	84
11. Reacción antígeno-anticuerpo e inhibición de la actividad del complejo bc <sub>1</sub> en presencia de fragmentos Fab.	91

12. Modelo teórico sobre la participación de la subunidad VIII en la actividad del complejo bc <sub>1</sub> mitocondrial de corazón de bovino.	93
13. Purificación de la subunidad VIII a partir del complejo bc <sub>1</sub> mitocondrial.	98
14. Obtención de anticuerpos contra la subunidad VIII pura.	99

## V. DISCUSION.

1. Importancia de los fosfolípidos en la estructura de las proteínas y en la interacción antígeno-anticuerpo.	101
2. Reacción antígeno-anticuerpo inespecífica obtenida con suero preinmune.	107
3. Topología del complejo bc <sub>1</sub> .	108
4. Topología de la región amino-terminal del citocromo b.	114
5. Antigenicidad de la subunidad VIII o "proteína de unión" del complejo bc <sub>1</sub> .	115

VI. CONCLUSIONES.	118
-------------------	-----

VII. PERSPECTIVAS.	119
--------------------	-----

VIII. BIBLIOGRAFIA.	121
---------------------	-----

## RESUMEN.

El estudio sobre la función de las subunidades "supernumerarias" en el complejo III de eucariontes tiene a la fecha gran relevancia. Existen trabajos realizados con reactivos de entrecruzamiento como carbodiimidias solubles con los cuales se ha podido sugerir la probable participación de las subunidades de bajo peso molecular como la subunidad VIII durante la transferencia de electrones en el complejo bc<sub>1</sub>, así como los sitios de interacción entre los citocromo c<sub>1</sub> y c soluble (Gutweniger y col, 1983; González-Halphen y col, 1988 y Broger y col, 1980).

De la misma manera, se han reportado estudios en los cuales se propone cuáles son las subunidades, de otros complejos respiratorios como el complejo IV (citocromo oxidasa), que interactúan con el citocromo c durante la transferencia de electrones (Bisson y Montecucco, 1982).

Tomando en cuenta que a lo largo del tiempo se han utilizado en gran medida técnicas bioquímicas para presentar evidencias a este respecto, recientemente algunos grupos de investigación han comenzado a utilizar técnicas de tipo inmunoquímico con las cuales se ha podido sugerir la importancia de dichas subunidades en el complejo III mitocondrial. Estos trabajos han sido realizados con anticuerpos específicos dirigidos contra las subunidades de interés (en estos casos la subunidad VI y citocromos b y c, de corazón de bovino y *Rhodospseudomonas sphaeroides*) obteniendo una comparación de las inhibiciones de la actividad del complejo con las cuales se puede sugerir la importancia de tales subunidades en la composición del complejo.

De acuerdo a los estudios anteriormente mencionados, el objetivo del presente trabajo se centró en realizar un estudio inmunoquímico (con anticuerpos específicos

contra las subunidades de alto peso molecular del complejo bc<sub>1</sub>) con el fin de proporcionar una evidencia inmunoquímica que apoyara los estudios realizados acerca de cómo y en qué grado participan cada una de estas subunidades en la actividad del complejo, así como obtener anticuerpos específicos contra la subunidad VIII pura para corroborar al función sugerida acerca de su papel durante la transferencia de electrones.

Para responder a esas preguntas, se realizaron mediciones del complejo bc<sub>1</sub> delipidado utilizando cada uno de los anticuerpos correspondientes así como preparaciones de IgG puras y fragmentos Fab evaluando la reacción antígeno-anticuerpo por medio de la técnica de ELISA y por medio de la inhibición de la actividad del complejo expresada en  $\mu\text{mol}$  de cit c reducido/min/mg de proteína.

Los resultados obtenidos mostraron una inhibición de la actividad mayor cuando el complejo fué incubado en presencia de anticuerpos específicos contra las subunidades ubicadas hacia la matriz mitocondrial (subunidades I, II y VI). Estos datos sugieren que el sitio Q<sub>i</sub> es más sensible al bloqueo por anticuerpos que el sitio Q<sub>o</sub>, lo cual es consistente con datos anteriormente reportados para el complejo bc<sub>1</sub> de levadura (Japa y col, 1987).

## I. INTRODUCCION.

### 1. La cadena respiratoria mitocondrial.

A lo largo del tiempo, diversos grupos de investigadores se han dado a la tarea de estudiar cuáles son los mecanismos utilizados por los complejos respiratorios para llevar a cabo la transferencia de electrones en la membrana interna mitocondrial. Algunos de estos grupos han utilizado estrategias bioquímicas para llevar a cabo éste tipo de estudios.

Algunos trabajos como los realizados por el grupo de Hatefi y col. (1962) han mostrado que la cadena respiratoria o cadena de transferencia de electrones está formada por cuatro complejos muropeptídicos designados de acuerdo a la función que realizan como: NADH-ubiquinona óxido-reductasa (complejo I), Succinato-ubiquinona óxido-reductasa (complejo II), Ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa (complejo III) y Citocromo c oxidasa (complejo IV).

La principal función de la cadena respiratoria mitocondrial radica en aceptar electrones de substratos como el NADH y el succinato y transferirlos en una serie de etapas discretas hasta el oxígeno molecular, conservando la energía generada en este conjunto de reacciones como un gradiente electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial el cual es aprovechado por la ATP-sintasa (complejo V) para generar ATP.

En la Figura 1A, se muestra un modelo acerca de la distribución de dichos complejos en la membrana interna mitocondrial, (Capaldi, 1991). En este esquema se puede

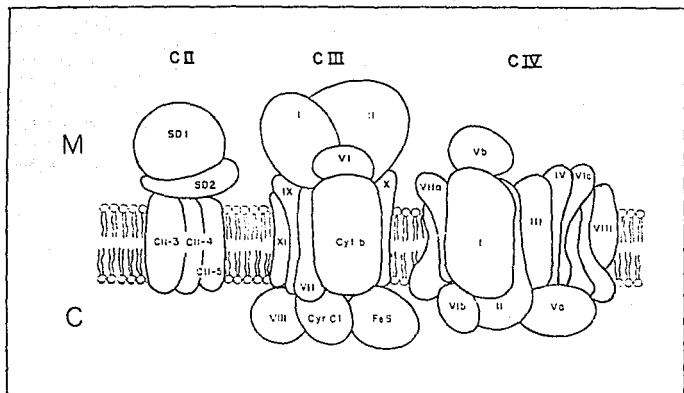


observar como algunas de las subunidades de cada complejo cruzan la bicapa lipídica. Es de interés hacer notar que en los complejos III y IV las subunidades que son codificadas por el ADN mitocondrial cruzan la membrana interna mitocondrial más de una vez. En la **Figura 1B**, se muestran algunos de los complejos de la membrana que se encuentran como dímeros, esto se ha propuesto por medio de estudios de sedimentación y entrecruzamiento; El complejo I (Albracht y col, 1977 y Dooljewaard y col, 1978), el complejo III (Leonard y col, 1981), la citocromo c oxidasa (Robinson y Capaldi, 1977), la transhidrogenasa (Anderson y Fisher, 1978) y la ATP-ADP translocasa (Hackenberg y Klingenberg, 1980) se obtienen como proteínas diméricas cuando se solubilizan con detergentes no iónicos. El complejo III y la citocromo c oxidasa también se encuentran como dímeros al ser incorporados en vesículas lipídicas.

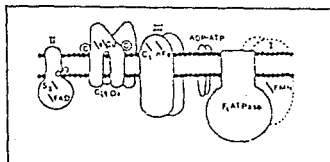
Capaldi (1982) y Hatefi (1985) reportaron algunas características acerca de los complejos respiratorios. Se sabe que el complejo I contiene FMN y 6-7 centros de hierro no hémicos como grupos prostéticos con 30 diferentes polipéptidos; el complejo II contiene FAD y tres centros de hierro no hémicos con 5 diferentes polipéptidos; el complejo III contiene 2 hemo tipo b, un hemo tipo c<sub>1</sub>, un centro de hierro no hémico y 11 diferentes polipéptidos; el complejo IV contiene dos hemo tipo a y dos átomos de cobre con 13 diferentes polipéptidos y por último la ATP sintetasa está compuesta por una fracción soluble en agua denominada F<sub>1</sub> y una insoluble llamada F<sub>0</sub>. La región F<sub>1</sub> retiene la actividad de ATPasa pero no sintetiza ATP.

De acuerdo a las propiedades de fluidez de la membrana se ha propuesto que cada proteína membranal posee un grado de difusión o libertad rotacional determinado por su

A



B



**Figura 1 A.** Esquema de la topología de los complejos II, III y IV en la cadena transportadora de electrones. M: matriz mitocondrial C: citoplasma, CII: complejo II (Succinato deshidrogenasa), CIII: complejo III (Ubiquinol citocromo c reductasa) y CIV: complejo IV (Citocromo oxidasa)(Capaldi, 1991). **B.** Modelo de la disposición de algunos de los complejos integrantes de la cadena respiratoria mitocondrial que se encuentran en forma dimérica. II: complejo II, III: complejo III, Cit Ox: complejo IV y  $F_1F_0$  ATPasa: complejo V. (Capaldi, 1982).

masa intrínseca. Esto no necesariamente disminuye la velocidad de transferencia de electrones en la mitocondria, ya que la velocidad de difusión de la ubiquinona (dentro de la membrana interna) y el citocromo c soluble (sobre el lado citoplásmico de la membrana interna) es independiente de la viscosidad en el espacio de la matriz.

Por medio de estudios realizados por Anderson y col (1981) y Chomyn y col (1985) se sabe que el ADN mitocondrial, en mamíferos, codifica para 13 diferentes polipéptidos, 11 de los cuales son componentes de los complejos que llevan a cabo la transferencia de electrones. Estos incluyen 7 subunidades del complejo I, el citocromo b del complejo III y 3 de las subunidades de mayor peso molecular de la citocromo c oxidasa.

La cadena de transferencia de electrones en eucariontes contrasta con la equivalente en bacterias por su gran complejidad. Algunas bacterias aeróbicas poseen una cadena de transferencia de electrones con los mismos grupos prostéticos y la misma función, pero con un número mucho más reducido de polipéptidos. Los grupos de Yagi en 1986 y Berry en 1985 reportaron que en *Paracoccus denitrificans*, por ejemplo, el complejo I contiene de 10-11 subunidades, el complejo II, 4 subunidades y el complejo III, 3 subunidades (incluyendo el citocromo b, citocromo c, y la proteína hierro-azufre), mientras que la citocromo c oxidasa también contiene 3 subunidades que son homólogas a las 3 subunidades codificadas mitocondrialmente, por lo que el interés por comparar a cada uno de los complejos respiratorios en diversos organismos ha permitido establecer inferencias sobre su origen evolutivo.

## 2. El Complejo III mitocondrial (complejo bc<sub>1</sub>).

La ubiquinol-citocromo c óxido-reductasa (también conocida como complejo bc<sub>1</sub> o complejo III) es una proteína membranal oligomérica que forma parte de la cadena respiratoria mitocondrial y de cadenas de transferencia de electrones de numerosas bacterias las cuales usan oxígeno, nitrógeno y azufre como aceptores terminales de electrones.

El complejo bc<sub>1</sub> varía en composición polipeptídica de acuerdo a la gran variedad de organismos que lo poseen. El complejo bc<sub>1</sub> proveniente de células de corazón de bovino está constituido por 11 subunidades (Schagger y col, 1987; González-Halphen y col, 1988), tres de las cuales poseen grupos prostéticos redox, tal es el caso de la subunidad III o citocromo b (que presenta dos hemos tipo b), la subunidad IV o citocromo c<sub>1</sub> (que posee un hemo tipo c<sub>1</sub>) y la subunidad V o proteína hierro-azufre (que presenta un centro Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>). Estas tres subunidades son indispensables para la función del complejo, ya que son las únicas que poseen centros redox. Las subunidades restantes han sido denominadas "subunidades supernumerarias" (Trumpower, 1990) y sus características serán revisadas posteriormente. Otros eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae* poseen un complejo bc<sub>1</sub> con 9 subunidades, 2 menos que en mamíferos. Sin embargo, si se explora el resto de la escala filogenética, se observa que en organismos procariontes como *Paracoccus denitrificans* y *Rhodospirillum rubrum*, el número de subunidades en el complejo bc<sub>1</sub> se reduce a 3: el citocromo b, el citocromo c<sub>1</sub> y la proteína hierro-azufre (centros redox indispensables para la función del complejo) o procariontes como *Rhodobacter capsulatus* en los cuales el complejo bc<sub>1</sub> está constituido

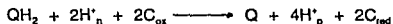
por 4 subunidades (Trumpower, 1990). La Tabla 1, muestra una comparación en la composición de subunidades del complejo bc<sub>1</sub> purificado de diversos organismos.

También se han encontrado complejos homólogos al complejo bc<sub>1</sub>, denominados b<sub>6</sub>f, que están involucrados en el transporte de electrones fotosintético en los cloroplastos de plantas superiores y en las cianobacterias (Hauska y col. 1983).

### 2.1 Mecanismo de transferencia de electrones en el complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial.

En todos los casos anteriormente descritos, el complejo bc<sub>1</sub> tiene como función transferir electrones a partir de una hidroquinona de bajo potencial hasta un citocromo c (o plastocianina, en el caso de los complejos b<sub>6</sub>f) depositando 4 protones en el lado electropositivo de la membrana (constituido en el caso de mamíferos por el espacio intermembranal de la mitocondria) por cada par de electrones transferido a 2 moléculas de citocromo c soluble.

La reacción catalizada por el complejo bc<sub>1</sub> se puede expresar con la siguiente ecuación:



en la cual *n* y *p* describen el lado negativo y positivo de la superficie membranal y c<sub>ox</sub> y c<sub>red</sub> se refieren al citocromo c oxidado y reducido.

La actividad próton-motriz del complejo bc<sub>1</sub> convierte la energía libre disponible de la reacción de transferencia de electrones en un gradiente de protones electroquímico. Este proceso es uno de los mecanismos más importantes de transducción de energía

Subunidad	<i>P. denitri- ficans</i> (♦)	<i>Rb. capsu- latus</i> (Ç)	<i>Rb. sphae- roides</i> (Ç)	Espinaca (⊛)	<i>S. cerevi- sae</i> (♦)	<i>N. crassa</i> (⊛)	Papa (▲)	Bovino (♦)
I	--	--	--	--	50	50	60	50
II					45	46	56.6	46
III (b) (b <sub>6</sub> )	39	42.1	42.8	23	42	42	52.8	42.6
IV (c) (f)	62	31.2	32.7	33	42	29	32	27.3
V (FeS)	20	22.5	20	20	25	22	24.8	21.4
VI	--	19.8	13	17	14	14	--	13.4
VII	--	--	5	5	--	12	13.1	9.5
VIII	--	--	--	--	17	11	9	9.2
IX	--	--	--	--	11	8	7.5	7.9
X	--	--	--	--	--	--	6.4	7.2
XI	--	--	--	--	--	--	--	6.4

Los pesos moleculares aparentes (KDa) fueron determinados para todos los casos por EGPA-SDS. Datos tomados de: Ljungdahl y col, 1987 (Ç); Weiss y Leonard, 1987 (⊛); González-Halphen, 1990 (♦) y Berry y col, 1991 (▲).

Tabla 1. Comparación de la composición polipeptídica del complejo bc<sub>1</sub> obtenido de algunos organismos.

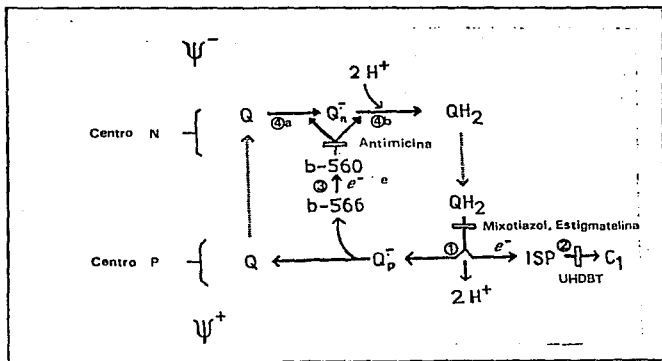
en la célula (Trumpower, 1990).

El complejo bc<sub>1</sub> está normalmente integrado a una membrana, la cual funciona como una barrera osmótica entre los centros redox del lado citoplásmico y los centros del lado de la matriz. La translocación del ubiquinol (QH<sub>2</sub>) y de la ubiquinona (Q) (pero no de la ubisemiquinona (Q<sup>-</sup>)), dependen de una movilidad activada termicamente en la membrana, que se puede considerar una barrera osmótica en la cual los fosfolípidos forman una parte esencial (Yu y col, 1973; Baum y col, 1967).

El mecanismo por medio del cual el complejo bc<sub>1</sub> acopla la transferencia de electrones con la translocación de protones es denominado el "Ciclo Q proton matriz", el cual describe la vía de transferencia de electrones entre los grupos prostéticos del complejo bc<sub>1</sub> (Mitchell, 1975).

En la **Figura 2** se esquematiza el posible mecanismo de transferencia de electrones y translocación de protones (Ciclo Q) en el complejo bc<sub>1</sub> (Trumpower, 1990).

En la etapa 1 del ciclo Q, el ubiquinol (QH<sub>2</sub>) es oxidado en el centro P en una reacción concertada, en la cual un electrón es transferido a la proteína hierro-azufre (ISP) formándose un anión de ubisemiquinona (Q<sup>-</sup>) el cual inmediatamente reduce al hemo b-566. En esta oxidación se depositan 2 protones en el lado positivo de la membrana: uno es liberado con la oxidación del ubiquinol a ubisemiquinona y el segundo es liberado junto con la formación del anión ubisemiquinona. Dos electrones divergen en el centro P a partir del ubiquinol: uno es transferido a la proteína hierro-azufre y a su vez al citocromo c<sub>1</sub> y finalmente al citocromo c soluble; el segundo electrón se transfiere del Q<sup>-</sup> al hemo b-566 y es reciclado a través del complejo bc<sub>1</sub>, pasando de un hemo b-566 de



**Figura 2.** Vía del "Ciclo Q protón motriz" y mecanismo de la translocación de protones en el complejo bc<sub>1</sub>. Símbolos:  $\longrightarrow$ : movimiento necesario del ubiquinol y ubiquinona entre el sitio de ubiquinol oxidasa (centro P) y el sitio de ubiquinona/ubisemiquinona reductasa (centro N); antimicina, estigmatelina y mixotiazol: inhibidores que bloquean la transferencia de electrones en la región indicada; Q: ubiquinona; Q: anión ubisemiquinona; QH<sub>2</sub>: ubiquinol; b-560 y 566: centros hemicos del citocromo b; ISP: proteína hierro-azufre y c<sub>1</sub>: citocromo c<sub>1</sub>. (Trumpower, 1990).



bajo potencial a un hemo b-560 de alto potencial. A su vez, el hemo b-560 reduce a la ubiquinona (Q) a el anión ubisemiquinona (Q<sup>-</sup>) en el centro N (Figura 2, paso 4a). En este punto el Ciclo Q todavía no ha sido completado. Una segunda molécula de ubiquinol es entonces oxidada por la proteína hierro-azufre, transfiriendo un electrón al citocromo c, para a su vez reducir a una segunda molécula de citocromo c, formando de nuevo un anión de ubisemiquinona y depositando otros 2 protones más en el lado P de la membrana. El anión ubisemiquinona reacciona por la misma vía previamente detallada, transfiriendo un electrón sucesivamente al hemo b-566 y al hemo b-560. El hemo b-560 reduce al anión ubisemiquinona estable (Q<sup>-</sup>) (previamente formado) a ubiquinol en el centro N, consumiendo dos protones del lado negativo de la membrana y completando el Ciclo Q (Figura 2, paso 4b).

El resultado neto del Ciclo Q completo, es que dos moléculas de ubiquinol son oxidadas a ubiquinonas, pero una molécula de ubiquinol es regenerada por la rerreducción de una de estas ubiquinonas. En el curso de este ciclo el citocromo b-560 alternadamente reduce a la ubiquinona a anión ubisemiquinona (etapa 4a) y de anión ubisemiquinona a ubiquinol (etapa 4b).

Una característica única del "Ciclo Q" es que existen dos vías para la reducción del citocromo b. Los hemos tipo b pueden ser reducidos:

- 1) Por el anión de ubisemiquinona en el centro P, como se describe en la etapa 1 de la Figura 2. Esta reducción es termodinámicamente favorecida y se lleva a cabo cuando el complejo bc<sub>1</sub> funciona catalíticamente, y

2) Por acción reversa de las etapas a y 4b en el centro N. Esta reducción es llevada a cabo por el ubiquinol o el anión de ubisemiquinona en condiciones de estado estacionario, siempre y cuando la reacción termodinámicamente favorecida a través del centro P esté bloqueada.

Esta doble reducción del citocromo b ha sido ampliamente demostrada con experimentos de inhibición de la transferencia de electrones con inhibidores específicos, tales como los realizados por Von Jagow y col, (1984 y 1985) en los cuales se utilizó mixotiazol para inhibir la reducción del citocromo b a través del centro P y la estigmatelina, la cual inhibe al centro de oxidación del ubiquinol en el lado C de la membrana mitocondrial. A dichos experimentos se les ha denominado de "doble muerte", ya que paradójicamente, la presencia de dos inhibidores ocasiona la reducción permanente de los hemos b-566 y b-560.

Por otra parte, considerando que el mecanismo de transferencia de electrones es un mecanismo cíclico, el grupo de Kubota y col (1992) ha sugerido que la unión de la quinona a la enzima así como la transferencia de electrones llevada a cabo entre la proteína hierro-azufre y el citocromo c<sub>1</sub>, son eventos que están controlados por la distribución de electrones dentro de la enzima.

## 2.2 Acción de inhibidores en el complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial.

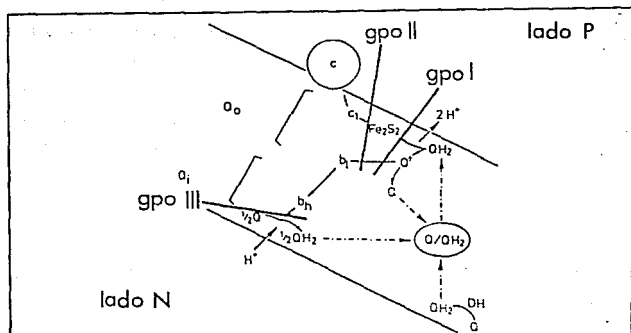
La transferencia de electrones que se lleva a cabo por medio del ciclo Q, es susceptible a la acción de inhibidores en diferentes etapas de la vía. Estos inhibidores que se han clasificado en tres grandes grupos de acuerdo a su sitio de acción (Von Jagow y Link, 1986):

1) **Grupo I:** Varios  $\beta$ -metoxiacrilatos, los cuales se unen en el sitio Q<sub>o</sub> bloqueando dos reacciones al mismo tiempo: la transferencia de electrones a partir del ubiquinol al centro hierro-azufre y la transferencia de electrones sobre el hemo b de bajo potencial. Dentro de este grupo se encuentran el mixotiazol, las estrobirulinas A, B y C, y las odemansinas A y B.

2) **Grupo II:** Análogos de la hidroxiquinona, los cuales se unen al sitio Q<sub>o</sub> bloqueando la transferencia de electrones del centro hierro-azufre al citocromo c<sub>1</sub> y consecuentemente la transferencia de electrones al hemo b de bajo potencial. Estos inhibidores son las estigmatelinas A y B, el UHDBT y el UHNQ.

3) **Grupo III:** Antimicina y funiculosina y ciertos análogos de quinona, los cuales se unen al sitio Q<sub>i</sub> bloqueando la transferencia de electrones del centro hemo b de bajo potencial a la ubiquinona en el lado N de la membrana.

En la **Figura 3** se esquematiza el modo de acción de los tres grupos de inhibidores.



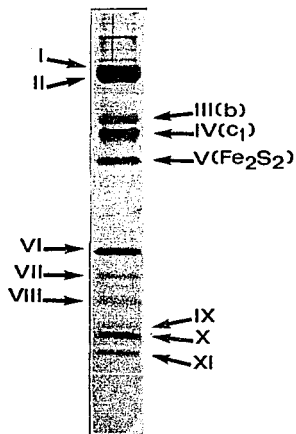
**Figura 3.** Esquema de las regiones en el ciclo Q, en las cuales actúan los diferentes grupos de inhibidores. Lado C y M: citoplasma y matriz respectivamente; Q: ubiquinona;  $QH_2$ : ubiquinol;  $Q^-$ : anión de ubisemiquinona;  $Q_o$  y  $Q_i$ : centros externo e interno de la quinona;  $b_h$  y  $b_l$ : citocromos b de alto y bajo potencial;  $Fe_2S_2$ : proteína hierro-azufre;  $c_i$ : citocromo  $c_i$  y  $c$ : citocromo c soluble (Von Jagow y Link, 1986).

### **2.3 Características de las subunidades del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial.**

Todos los complejos bc<sub>1</sub> contienen por lo menos tres proteínas con grupos prostéticos redox: el citocromo b (el cual posee dos hemo tipo b unidos no covalentemente), el citocromo c<sub>1</sub> (con un grupo hemo de tipo c unido covalentemente a la proteína a través de enlaces tiol-éter) y la proteína hierro-azufre (la cual posee Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> ligados coordinadamente por dos cisteínas y dos histidinas). Sin embargo, en el complejo bc<sub>1</sub> de mitocondrias de corazón de bovino (tema de este trabajo) existen 8 subunidades más de las cuales algunas todavía no se conoce con certeza su función (Figura 4). Algunas de las características que se han descrito para cada una de las subunidades se resumen a continuación:

#### **Citocromo b.**

El citocromo b es una proteína integral de membrana hidrofóbica y politópica, de aproximadamente 400 residuos de aminoácidos, que varía en su peso molecular de 38 a 48 KDa, de acuerdo a las especies que se trate. Diversos experimentos con sondas intercaladas en la membrana (Gutweniger y col, 1981 y González-Halphen y col, 1988), el uso de fusiones génicas en bacterias (Yun y col, 1991) así como perfiles de hidropatía realizados para diversos citocromos b (Saraste, 1984; Widger y col, 1984) han demostrado que esta proteína posee 9  $\alpha$ -hélices, 8 de las cuales se encuentran totalmente embebidas en la membrana interna mitocondrial (en el caso de eucariontes), o en la membrana plasmática (en el caso de bacterias). La hélice 4 es anfifílica y se ha



**Figura 4.** Patrón electroforético en un gel de poliacrilamida-SDS al 16 %, del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial obtenido a partir de corazón de bovino. I y II: subunidades estructurales; b: subunidad III o citocromo b; c<sub>1</sub>: subunidad IV o citocromo c<sub>1</sub>; Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: subunidad V o proteína hierro-azufre; VI: subunidad VI; VII: subunidad VII; VIII: subunidad VIII o "proteína de unión" y IX, X y XI: subunidades de bajo peso molecular.

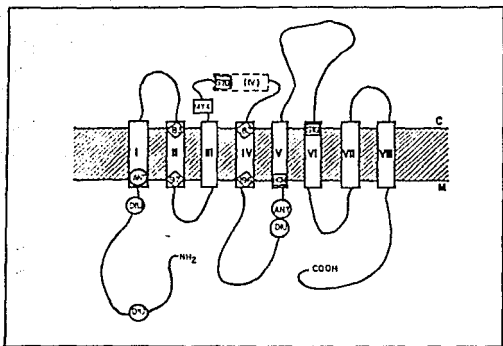
propuesto que se encuentra en la región externa de la membrana interna (Trumpower, 1990; Yun y col, 1991). La **Figura 5** muestra la estructura secundaria predicha para el citocromo b y su posible disposición en la membrana.

El gene que codifica para el citocromo b en eucariontes es monocistrónico y se encuentra en el genoma mitocondrial, mientras que el gene del citocromo  $b_6$  del complejo  $b_6f$  es bicistrónico y se haya en el ADN del cloroplasto.

El citocromo b y el citocromo  $b_6$  poseen dos centros hémicos y cuatro residuos de histidina conservados en todos los citocromos b ubicados por pares en las helices 2 y 5 por un arreglo transmembranal, probablemente en un "paquete 4- $\alpha$ -helicoidal" formado por las helices 2, 3, 4 y 5 (Link y col, 1986). Estos dos centros hémicos constituyen una vía de electrones de "bajo potencial" a través de la membrana.

#### **Citocromo $c_1$ .**

El citocromo  $c_1$  junto con la proteína hierro-azufre forma la vía de electrones de "alto potencial" a lo largo de la superficie externa de la membrana. Este citocromo está expuesto hacia el espacio intermembranal, unido a la membrana interna por una sola  $\alpha$ -hélice hidrofóbica. El citocromo  $c_1$  es una proteína ácida unida a la membrana por un dominio hidrofóbico en la región carboxi-terminal. Su peso molecular es de 27.9 KDa en bovino. El hemo tipo  $c_1$  está covalentemente unido a la proteína a través de dos residuos de cisteína y posee a su vez residuos de histidina y metionina que son los ligandos axiales del hemo. Una de las características poco usuales en la estructura de



**Figura 5.** Modelo de ocho hélices hidrofóbicas propuesto para la estructura secundaria del citocromo b en la membrana interna mitocondrial. M: matriz; C: citoplasma; ANT: antimicina; DIU: diurón y STG: estigmatelina (Crofts y col, 1987).



esta proteína es la presencia de una serie de estructuras  $\beta$ -plegadas hidrofóbicas distribuidas a lo largo de la secuencia de aminoácidos (Trumpower, 1990 y Link y col, 1987).

### **Proteína Hierro-Azufre.**

La proteína hierro-azufre es el oxidante del ubiquinol en el ciclo Q de transferencia de electrones presente en el complejo bc<sub>1</sub>. Tiene un peso molecular que varía entre 20 y 25 kDa y de acuerdo a estudios comparativos con diversas especies de organismos (Link y col, 1987) se ha demostrado que es una proteína que posee por lo menos el 20% de residuos cargados y dominios muy hidrofílicos. El segmento carboxi-terminal está fuertemente conservado y en cada caso estudiado (levadura, espinaca y bovino) hay un segmento hidrofóbico cercano a la región amino-terminal.

Esta proteína ha sido objeto de diversos estudios como digestión con proteasas y marcaje con reactivos de fotoafinidad, estudios de resonancia paramagnética del electrón en la proteína hierro-azufre de levaduras, así como estudios con el cADN que codifica para esta proteína en plantas superiores (maíz y tabaco) (González-Halphen y col, 1988; Trumpower, 1981; Huang y col, 1991 respectivamente) con los cuales se han podido obtener datos en los que se demuestra que la proteína hierro-azufre está localizada en la periferia de la membrana interna mitocondrial en el caso de bovino, posiblemente unida al citocromo b a través de interacciones hidrofóbicas involucrando a la región amino-terminal. Por otro lado en levaduras, se ha mostrado que la región amino terminal de esta proteína es crucial para una conformación, procesamiento e interacción correcta

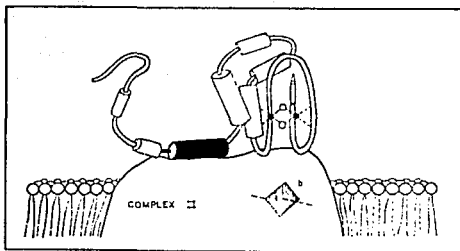
con otras proteínas del complejo bc<sub>1</sub>. Posteriormente se ha determinado (González-Halphen y col, 1991) que la región que une a esta proteína con el resto del complejo está constituida por una región de 18 residuos de aminoácidos limitados por la Lys<sup>33</sup> y la Lys<sup>52</sup> (la Figura 6 muestra el modelo propuesto para la topología de esta proteína).

### **Proteínas estructurales I y II.**

Estas dos proteínas junto con las de bajo peso molecular han sido denominadas por Trumpower (1990) como polipeptidos supernumerarios, enfatizando el hecho de que se encuentran como un "exceso" del número mínimo de polipéptidos necesarios para la transferencia de electrones en el complejo bc<sub>1</sub>. Una comparación en el número de subunidades de este complejo en diferentes organismos se mostró en la Tabla 1. La secuencia de aminoácidos para estas proteínas ha sido obtenida a partir de diversos organismos como levaduras, *N. crassa* y bovino (Tzagoloff y col, 1986 y Oudshoorn y col, 1987; Weiss y Neupert, 1990; Gencic y col, 1991 respectivamente) y se ha podido determinar un peso molecular aparente de 49 KDa para la subunidad I y de 47 KDa para la subunidad II en el complejo bc<sub>1</sub> de bovino.

Estas dos proteínas están próximas una a otra, se extienden en el lado de la matriz mitocondrial y no poseen dominios de anclaje a la membrana (Karlsson y col, 1983 y Tzagoloff y col, 1986).

En estudios realizados por el grupo de Tzagoloff y col (1986) se ha observado que una delección en la subunidad I del complejo bc<sub>1</sub> de *Sacharomices cerevisiae* provoca que no se inserte el grupo hemo al apocitocromo b. De igual forma, si se produce una



**Figura 6.** Esquema que muestra el arreglo estructural adquirido por la subunidad V en el complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial. La región oscura indica la secuencia delimitada por los residuos de  $\text{Lys}^{33}$  y  $\text{Lys}^{52}$  con los cuales interactúa con el citocromo b. b: uno de los centros hémicos del citocromo b (González-Halphen, 1991).

delección en la subunidad II, se bloquea la maduración del citocromo b. De acuerdo a estos resultados se propone que estas proteínas son importantes para la biogénesis y función del citocromo b en el complejo.

Estudios más recientes realizados por Schulte y col (1989) y Weiss y col, (1990) han demostrado que la subunidad I obtenida del complejo bc, de *Neurospora crassa* es semejante a la proteína PEP, una proteína que estimula la actividad proteolítica de una proteasa procesadora de matriz y por lo tanto, que dicha subunidad tiene un papel importante en la biogénesis del complejo.

Las proteínas estructurales también han sido estudiadas por Sidhu y Beattie (1981) y por Berry y col (1991) en el complejo bc, de levadura y papa respectivamente, observándose en el primer caso que las dos subunidades están embebidas en el complejo ya que son inaccesibles a la acción de proteasas exógenas. Por otra parte el patrón electroforético de las subunidades de papa obtenido en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, indica la presencia de tres subunidades estructurales, lo cual resulta ser un caso único entre los complejos bc, caracterizados a la fecha.

#### **Subunidades de bajo peso molecular.**

Entre las subunidades de bajo peso molecular del complejo bc, de corazón de bovino se encuentran la subunidad VI (con un peso molecular de 13.4 KDa), la subunidad VII (11 KDa), la subunidad VIII (9.2 KDa), la subunidad IX (8 KDa), la subunidad X (7.2 KDa) y la subunidad XI (6.4 KDa).

Las subunidades VI y VII ha sido ampliamente estudiadas en levadura. Algunos de

estos estudios han demostrado que la subunidad VI está localizada en la superficie citoplásmica de la membrana interna mitocondrial por lo que se considera la homóloga a la subunidad VIII de corazón de bovino (Kim y col, 1987).

Por otra parte se ha podido observar que si se produce una delección en la subunidad VI de levadura se provoca que uno de los monómeros del complejo bc, se inactive. De esta forma se propone que la subunidad VI provoca que el complejo bc, funcione como monómero o dímero de acuerdo a las condiciones de fuerza iónica (Schmitt y Trumpower, 1990).

Con respecto a la subunidad VII de levadura, se cree que está localizada en el lado de la matriz de la membrana, en contraste con la de bovino, en donde está integrada a la membrana interna mitocondrial asociada fuertemente con el citocromo b (González-Halphen y col, 1988). Su función está probablemente relacionada con la unión de quinona.

La subunidad VIII, también llamada "proteína de unión", ha sido estudiada por diversos grupos a partir de los 80's. Kim y King (1981), la describen como una proteína necesaria para la formación de un complejo entre los citocromos c, y c soluble durante la transferencia de electrones. La subunidad VIII fué purificada a partir de una preparación que contenía a los complejos II-III de corazón de bovino.

Posteriormente el grupo de Wakabayashi y col (1982) obtuvieron la secuencia de aminoácidos de una proteína de aproximadamente 11 KDa de peso molecular por el método de electroforesis y de 9.2 KDa por estudios de secuencia de aminoácidos obtenida del complejo bc, de corazón de bovino. Una particularidad observada en este

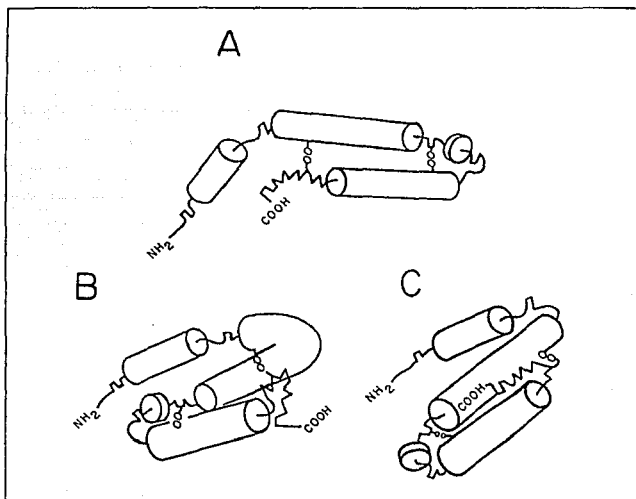
estudio fué la ausencia de residuos de tirosina y triptofano en su secuencia, de aquí su característica de presentar una baja absorción a 280 nm.

La subunidad VIII es una proteína que posee una baja tinción con azul de Coomassie (comparada con la tinción obtenida para otras subunidades) cuando es sometida a electroforesis en presencia de SDS (Kim y King, 1983). Otra característica importante de esta proteína es que posee 8 residuos de ácido glutámico cerca de la región amino-terminal. La posible función de la subunidad VIII propuesta en este trabajo, se refiere a un posible cambio conformacional (producido por ésta subunidad sobre el citocromo  $c_1$ ) para interactuar con el citocromo c soluble. Otros estudios relacionados a este respecto (Kim y col, 1989) han podido demostrar que cuando la subunidad VIII se une al citocromo  $c_1$ , ocurre un cambio conformacional dentro de un rango de aproximadamente 5 Å medido a partir del hierro hémico del citocromo  $c_1$ .

Un modelo acerca de la estructura secundaria de esta proteína ha sido propuesto (Mukai y col, 1985) basados en la secuencia de aminoácidos previamente descrita (Figura 7).

La subunidad X ha sido secuenciada por el grupo de Schägger y Von Jagow (1983) y se pudo predecir que la estructura secundaria de esta subunidad pequeña puede ser de importancia funcional. La proteína no contiene cisteínas y no hay grandes regiones apolares en la secuencia, sin embargo, existe una serie de residuos básicos agrupados en la región carboxi-terminal.

Finalmente la subunidad mas pequeña del complejo, la subunidad XI, ha sido secuenciada por Schagger y col (1985) y tiene un peso molecular aproximado de 6.4



**Figura 7.** Modelo propuesto para la estructura secundaria adquirida por la subunidad VIII obtenida de acuerdo a su secuencia de aminoácidos. **A:** Representación de una sola vuelta; **B y C:** representación de dos vueltas;  $-S-S-$  : enlaces disulfuro;  $\alpha$  :  $\alpha$ -hélice,  $\beta$  :  $\beta$ -plegada y  $\Delta$  : vueltas o torciones (Mukai y col, 1985).

KDa. Su función es todavía desconocida, aunque se sabe que se disocia fácilmente del complejo, sin afectar su actividad transportadora de electrones.

### **3. Biogénesis del Complejo bc<sub>1</sub>.**

Las 10 subunidades del complejo bc<sub>1</sub>, que son codificadas por el genoma nuclear, son sintetizadas en el citoplasma e importadas postraduccionalmente a la mitocondria.

De acuerdo al modelo generalizado para el importe de las proteínas mitocondriales, las subunidades que son sintetizadas en el citoplasma contienen una secuencia blanco que es eliminada postraduccionalmente en una o dos etapas, por la acción de proteasas que están localizadas en la matriz o en la membrana interna mitocondrial. Estas secuencias varían en longitud, pero frecuentemente están cargadas positivamente y algunas de ellas están enriquecidas en residuos de serina y treonina y son capaces de formar helices anfipáticas (Roise y Schatz, 1988 y Roise y col, 1988).

No todas las subunidades del complejo bc<sub>1</sub>, que son procesadas postraduccionalmente e importadas a la mitocondria, lo hacen a través del mismo mecanismo. A la fecha se sabe que las subunidades I y II, el citocromo c<sub>1</sub> y la proteína hierro-azufre son procesadas e importadas de acuerdo al modelo propuesto por Hartl y col (1986): el precursor es translocado vía sitios de contacto entre las membranas mitocondriales; posteriormente se lleva a cabo un corte de ocho residuos del péptido señal, formando un intermediario. Este intermediario es redirigido de la matriz a la membrana interna, procesado a su forma madura y ensamblado en el complejo III

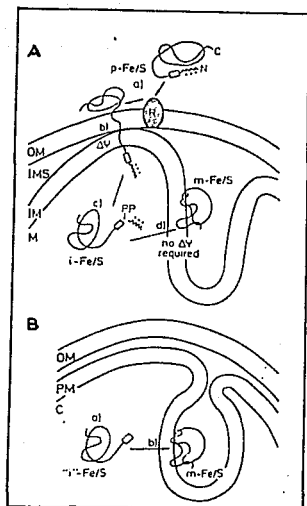


maduro (Figura 8).

El importe de las otras subunidades no sigue este modelo. Tres de estas proteínas, las subunidades 7, 8 y 9 son procesadas postraduccionalmente en una metionina presente en el extremo amino-terminal. Estas subunidades carecen de una presecuencia como tal.

Pfanner y col (1991) realizaron estudios para identificar los receptores membranales que son necesarios para el importe de estas proteínas. Actualmente han sido identificados varios receptores de la membrana externa mitocondrial (MOM) como MOM19, MOM72; proteína de la membrana externa mitocondrial (proteína del sitio de importe) MOM38 (=ISP42) y una proteína de la membrana interna de levadura p32, de las cuales las tres primeras están presentes en un complejo de multisubunidades que catalizan el reconocimiento y la inserción membranal de las proteínas precursoras.

Otros estudios para dilucidar el mecanismo de importe de estas proteínas han sido realizados en *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* por los grupos de Crivellone y col (1988) y Teintze y col (1982) respectivamente. Estos estudios han revelado que las subunidades I, II, VI, VII y el citocromo c, interactúan unas con otras en la bicapa lipídica formando una estructura central dada por el apocitocromo b (este es el único que es sintetizado por el genoma mitocondrial). Posteriormente se integran los grupos prostéticos hemo en el apocitocromo b. La proteína hierro-azufre junto con las subunidades de bajo peso molecular son las últimas que se integran al complejo. Por otra parte la transferencia postraduccionnal de los precursores de las subunidades I, IV,



**Figura 8.** Modelo propuesto para el transporte y ensamblaje de la proteína hierro-azufre obtenida a partir de complejo bc, mitocondrial (A) y bacterial (B). OM: membrana externa; IMS: espacio intermembranal; IM: membrana interna; M: matriz; R: receptor; PP: peptidasa de procesamiento; PM: membrana plasmática;  $i\text{-Fe/S}$ : proteína precursora;  $m\text{-Fe/S}$ : proteína hierro-azufre madura y  $\Psi$  : potencial de membrana (Hartl y col, 1986).

V y VII en *Neurospora crassa* es dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Un esquema de la síntesis y ensamblaje del complejo bc<sub>1</sub> se muestra en la **Figura 9**.

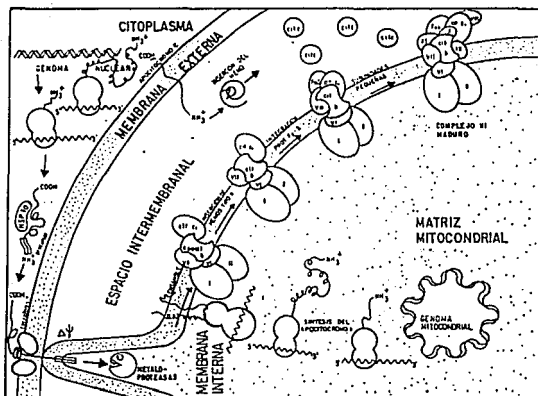
#### **4. Estudios cristalográficos del complejo bc<sub>1</sub>.**

Recientemente, algunos trabajos describen la cristalización del complejo bc<sub>1</sub> de *Neurospora crassa* y de corazón de bovino.

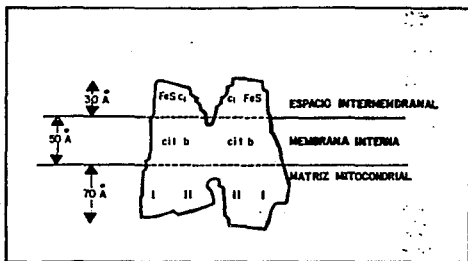
Los estudios de microscopía electrónica realizados por Weiss y col (1983) con cristales bidimensionales han mostrado un esquema de la ubicación de 4 subunidades del complejo bc<sub>1</sub> en *Neurospora crassa* (**Figura 10**). En este esquema se muestran a las subunidades I y II como subunidades hidrofílicas que se extienden a partir de la bicapa lipídica en la fase acuosa. En este modelo, las subunidades IV y V son anfifílicas. El mayor dominio de estas subunidades puede estar ubicado en la sección periférica del complejo.

El complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino ha sido cristalizado por diversos grupos, sin embargo en estos estudios se han obtenido únicamente datos preliminares de difracción de rayos X y de actividad del complejo cristalizado y resolubilizado (Yue y col, 1991; Kubota y col, 1991 y Berry y col, 1992).

Estos trabajos han reforzado todas las evidencias bioquímicas y de estudios de microscopía electrónica obtenidas hasta el momento, sin embargo, todavía faltan muchos estudios sobre cristales para poder conocer a nivel de resolución atómica la topología de cada una de las subunidades en el complejo.



**Figura 9.** Modelo propuesto para el ensamblaje de las 11 subunidades del complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino en la membrana interna mitocondrial. HSP 70: proteína de choque térmico;  $\Psi$ : potencial de membrana; Apocit b: apocitocromo b; cit c: citocromo c soluble (González-Halphen, 1990).



**Figura 10.** Modelo que muestra la topología de las subunidades I, II, III (citocromo b), IV (citocromo c<sub>1</sub>) y V (proteína hierro-azufre) obtenido a partir del complejo bc<sub>1</sub> de *Neurospora crassa* (Weiss y col, 1986).

## 5. Antecedentes.

Como se mencionó anteriormente, el número de subunidades del complejo bc, varía de acuerdo a cada organismo y a su lugar en la escala filogenética. Una de las preguntas que se ha presentado ha sido la de ¿cuál es la función de las subunidades llamadas "supernumerarias" presentes en los complejos de eucariontes?. El estudio de la función de cada una de estas subunidades ha sido evaluada por diversas estrategias bioquímicas y se puede decir que existen dos formas principales de explorar la función de las subunidades de un complejo oligomérico:

1) Disociar a la subunidad del complejo y medir su actividad en ausencia de ésta y luego reconstituir la actividad al adicionarla al complejo. Este tipo de experimentos solamente se han llevado a cabo para la proteína hierro-azufre (Shimomura y col, 1984; Trumpower y Edwards, 1978 y Engel y col, 1983) ya que en el caso de las otras subunidades, en ocasiones se requiere desnaturalizar parcialmente a las proteínas para poderlas separar del resto del complejo oligomérico, y

2) Bloqueando a la subunidad (integrada en el complejo) con algún agente (en particular anticuerpos) y midiendo la actividad del complejo con la subunidad bloqueada y sin bloquear.

De acuerdo a la segunda opción, algunos grupos han desarrollado estrategias inmunoquímicas con el complejo bc, de corazón de bovino para evaluar la actividad de algunas de sus subunidades.

Algunos trabajos pioneros fueron los desarrollados por Nelson y Mendel-Hartwig

(1977) en los cuales llevaron a cabo la caracterización de anticuerpos contra el complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino. La actividad del complejo se inhibe en presencia de estos anticuerpos utilizando el complejo soluble o incorporado a vesículas de fosfolípidos. Sin embargo, en este trabajo se utilizaron únicamente anticuerpos contra la holoenzima y no dirigidos contra subunidades específicas.

En 1986, el grupo de Haley y col. obtuvieron anticuerpos contra el citocromo b puro de corazón de bovino y de *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad del complejo disminuye notablemente si se hace reaccionar cada anticuerpo con el complejo puro correspondiente en ausencia de lípidos. Además cada anticuerpo muestra reacción cruzada con el citocromo de otro complejo, aunque inhibe la actividad en menor porcentaje.

Por otra parte, Usui y col (1991) obtuvieron anticuerpos específicos contra la subunidad VI del complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino. En este trabajo se pudo observar que la actividad del complejo disminuye cuando se hacen reaccionar los anticuerpos contra el complejo intacto antes de llevar a cabo la reconstitución con lípidos. Estos anticuerpos también fueron probados en preparaciones de mitoplastos y partículas submitocondriales, observándose una mayor reacción en el último caso, por lo que se confirmó que la subunidad VI está ubicada del lado de la matriz mitocondrial, como ya había sido propuesto anteriormente (González-Halphen y col, 1988).

A la fecha, no se han realizado estudios con anticuerpos específicos contra otras de las subunidades de bajo peso molecular en este complejo y como ya se mencionó anteriormente, el complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino posee 8 subunidades

supernumerarias, de las cuales algunas todavía no se conoce su función con exactitud. Una de ellas es la subunidad VIII, la cual parece estar involucrada indirectamente en la transferencia de electrones entre el citocromo  $c_1$  y el citocromo c soluble.

Algunas técnicas reportadas anteriormente (Wakabayashi y col, 1982 y Kim y King, 1981) han obtenido a esta subunidad en una forma parcialmente purificada, por lo que pensamos que sería un buen modelo de estudio para verificar su función con la estrategia inmunoquímica.

Se ha podido demostrar cómo es que se lleva a cabo la interacción entre el citocromo c soluble y algunas de las subunidades de los complejos respiratorios. El grupo de Broger y col (1980) ha utilizado derivados del citocromo c marcado con reactivos arilizado, con los cuales se encontró que el citocromo c soluble se une covalentemente al citocromo  $c_1$ , sin observarse un producto de entrecruzamiento con la subunidad VIII. Por otro lado, el grupo de Bisson y Montecucco (1982) ha reportado estudios con carbodiimidas solubles en agua con los cuales se demostró que la subunidad II del complejo IV (citocromo oxidasa) de corazón de bovino participa en la interacción con el citocromo c soluble.

Más recientemente, se han realizado estudios utilizando dos tipos de carbodiimidas solubles en agua (EDC y CMC) con el complejo III de corazón de bovino, en los cuales se ha podido encontrar una modificación de los grupos carboxilo de la subunidad VIII y el citocromo  $c_1$ , indicando que dichas subunidades están implicadas en la interacción con el citocromo c. Por otro lado, se han obtenido productos de entrecruzamiento (utilizando únicamente EDC) que involucran a la subunidad VIII y al citocromo  $c_1$  (Gutweniger y col,



1983 y González-Halphen y col, 1988), lo cual sugiere que la subunidad VIII es importante en las interacción entre los dos citocromos.

De acuerdo a lo anterior, encontramos interesante tratar de proporcionar otro tipo de evidencias, en este caso de tipo inmunoquímico, con las cuales se demuestre la participación de esta subunidad de bajo peso molecular en la interacción del citocromo c, con el citocromo c soluble.

De igual forma, el interés por demostrar cuál es la participación de las otras subunidades del complejo bc, podría ser evaluada por un enfoque inmunoquímico.

## **II. OBJETIVOS.**

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, los objetivos planteados para este trabajo son:

1) Llevar a cabo un estudio comparativo sobre la reacción antígeno-anticuerpo con seis anticuerpos específicos generados contra las seis subunidades de mayor peso molecular del complejo bc, de corazón de bovino, por medio de la utilización de pruebas inmunoquímicas, como la técnica de ELISA y la de inmunoréplcas tipo Western.

2) Evaluar la participación de cada una de éstas subunidades en la actividad de ubiquinol-citocromo c óxido reductasa del complejo bc, por medio de su inhibición parcial provocada por la reacción de los anticuerpos específicos para cada subunidad y de la reacción obtenida con inmunoglobulinas G purificadas.

3) Realizar un estudio comparativo acerca de la reacción antígeno-anticuerpo y de la inhibición de la actividad del complejo utilizando fragmentos Fab de dos anticuerpos específicos para las subunidades V y VI topológicamente localizadas en lados opuestos de la membrana mitocondrial.

4) Llevar a cabo la purificación de la subunidad VIII a partir de una preparación pura del complejo bc, de corazón de bovino, con el fin de estudiar su participación en la actividad del complejo. Así mismo, obtener anticuerpos específicos contra ésta

subunidad y/o contra un péptido con una secuencia parcial de esta proteína. Demostrar su función dentro del complejo, evaluada mediante las mismas estrategias inmunoquímicas, como la técnica de ELISA e inhibición de la actividad de ubiquinol-citocromo c óxido reductasa en el complejo purificado y delipidado.

### **III. METODOLOGIA.**

#### **1. Obtención de mitocondrias.** (Löw, H. y Vallin, I. 1963)

Se limpiaron los corazones del tejido graso para obtener únicamente el músculo cardíaco y se cortaron en trozos pequeños. La carne se molió y se pesó en porciones de 400 gramos a los cuales se le agregó 1200 ml del amortiguador (I) que contenía: sacarosa 250 mM, Tris-HCl 5mM (pH 7.5) y EDTA 2 mM. Posteriormente se ajustó el pH del homogenado a 7.5 con una solución de Tris saturado y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante obtenido se filtró por una gasa y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido en esta centrifugación se resuspendió en el amortiguador (II) que contenía: sacarosa 250 mM y Tris-HCl 5 mM (pH 7.5). Esta fracción se sometió a lavados con centrifugaciones de alta y baja velocidad (10,000 y 3,000 rpm respectivamente) obteniendo por último una fracción enriquecida de mitocondrias las cuales se resuspendieron en el amortiguador II.

#### **2. Purificación del complejo bc<sub>1</sub>.**

La metodología utilizada contiene algunas modificaciones del método reportado por Rieske (1967).

Una vez obtenidas las mitocondrias, se diluyeron hasta una concentración de proteína de 23 mg/ml usando el amortiguador TSH (Tris-HCl 0.05 M (pH 8.0), sacarosa 0.67 M

e histidina 0.001 M). Posteriormente se añadió desoxicolato de sodio al 10 % (pH 9.0), hasta una concentración final de 0.3 mg/mg de proteína, y KCl sólido (74.6 gr/l); se centrifugó 16 min a 45,000 rpm en un rotor 60 Ti y se midió el volumen del sobrenadante, al cual se le agregó 0.25 volúmenes de agua fría para después centrifugarlo en las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido se dializó con un amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) durante 3 horas y se centrifugó 45 min a 45,000 rpm.

La preparación anterior fue utilizada para preparar el complejo bc, crudo como sigue:

Se diluyó esta fracción a una concentración de proteína de 10 mg/ml con el amortiguador TSH y se le añadió desoxicolato de potasio al 10 % para dejarlo a una concentración de 0.5 mg/mg de proteína. Posteriormente se realizaron 3 precipitaciones con acetato de amonio saturado al 50 % (16.5 ml/100 ml de muestra; 6 ml/100 ml y 3.2 ml/100 ml) dejando reposar 15 min a 0 °C y centrifugando 16 min a 45,000 rpm en cada precipitación.

Se realizó una cuarta precipitación con acetato de amonio sólido (450 gr/l) dejando reposar de la misma forma y centrifugando 25 min a 45,000 rpm. El precipitado obtenido (el cual es el complejo bc, crudo) fue resuspendido finalmente en el amortiguador TSH.

Por último, para la obtención del complejo bc, puro, el complejo crudo se diluyó a una concentración de proteína de 10 mg/ml y se le agregó colato de potasio al 20 % para dejarlo a 0.25 mg/mg de proteína. De la misma forma que para el complejo crudo, se realizaron 4 precipitaciones con sulfato de amonio saturado (54 ml/100 ml; 9.35 ml/100

ml; 3.45 ml/100 ml y 11.5 ml/100 ml) dejando reposar 10 min a 0 °C y centrifugando 10 min a 45,000 rpm en cada caso.

El complejo bc, contenido en el último precipitado se resuspendió gentilmente con el amortiguador TSH y se almacenó a -70 °C.

### **3. Técnicas electroforéticas.**

#### **A) Geles analíticos.**

Este tipo de geles se utilizaron para visualizar 20 µg de las proteínas obtenidas en forma pura (complejo bc, fracción de subunidad VI y VIII, subunidad VIII pura e IgG puras) los cuales se resuspendieron en una mezcla de digestión (dejando una relación 1:1 de muestra:mezcla digestora que contenía Tris-HCL 100mM (pH 6.8), glicerol 30 %, azul de bromofenol 0.3 %, β-mercaptoetanol 4 % y SDS 10 %). Los geles fueron corridos a 100 V durante 10-12 horas a temperatura ambiente. Las proteínas fueron visualizadas por medio de la tinción de los geles con azul G de Coomassie o nitrato de plata (para el caso de las IgG) posterior a la fijación del gel.

Solo en el caso de las IgG, las muestras se colocaron 5 minutos en agua hirviendo para provocar la desnaturalización total de las cadenas pesadas y ligeras minutos antes de cargar las muestra al gel.

Las condiciones de electroforesis aplicadas para este tipo de geles así como las utilizadas para la fijación de las proteínas al gel, fueron las mismas que las reportadas por el método de Shägger y col, (1986) que a su vez es una modificación a la técnica original reportada por Laemmli (1970) en la cual se utiliza glicina en el amortiguador

superior en lugar de tricina.

En ésta técnica se utilizaron geles de poli(acrilamida) al 10 % para el caso de las IgG puras y al 16 % para el caso de las proteínas restantes en presencia de 0.3 % de SDS como agente desnaturizante.

Los amortiguadores utilizados durante la electroforesis fueron:

- 1) Amortiguador Superior (Catódico): Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1 %.
- 2) Amortiguador Inferior (Anódico): Tris-HCl 0.2 M (pH 8.9)

La mezcla utilizada para la preparación de los geles fué la siguiente:

	Gel Separador	Gel de Muestra
Acrilamida*	1.5 ml	0.25 ml
Amortiguador de geles**	2.5 ml	0.78 ml
Glicerol (0.795 % v/v)	0.8 ml (1g)	----
Agua destilada	2.5 ml	2.1 ml

\* La acrilamida utilizada fué una mezcla de acrilamida-bis acrilamida que se encontraba a una concentración de 49.5 %T y 3 %C [en donde T representa la concentración del monómero de acrilamida + bis-acrilamida en g/100 ml (% p/v) y C el % en peso de T debido al agente entrecruzador (bis acrilamida)].

\*\* El amortiguador de geles estuvo constituido de: Tris 3M, HCl 1 M y SDS 0.3 %.

## **B) Geles preteñidos.**

La electroforesis en geles preteñidos con azul G de Coomasie fué llevada a cabo siguiendo la técnica reportada por Schägger y col (1988). En esta técnica se utilizaron geles de acrilamida al 16 % en las mismas condiciones de SDS como agente desnaturizante que las mostradas en el inciso A).

En este tipo de electroforesis existe una variación en la composición del amortiguador superior (catódico) dada por la presencia de azul G de Coomasie, lo que permite visualizar a las proteínas durante el tiempo de corrida para posteriormente extraerlas del gel en forma aislada sin dañarlas.

Este tipo de electroforesis fué aplicado para geles de acrilamida de tamaño normal o geles grandes. El tiempo de corrida para estos últimos fué de aproximadamente 3 días (dado que el tamaño de cada gel fué de 40 x 50 cm de altura) aplicando 100 V a temperatura ambiente en ambos casos.

Este tipo de geles se utilizaron para la purificación de la subunidad VIII a partir de dos muestras: una que contenía al complejo bc, puro y otra que contenía a las subunidades VI y VIII puras (García-Ponce, 1992) cargando 80 µg de proteína en cada carril. En estos casos el gel no fué tratado con la solución fijadora ya que la finalidad de utilizar esta técnica fué la de poder extraer a las proteínas del gel.



Los amortiguadores utilizados fueron los siguientes:

- 1) Amortiguador Superior (Catódico): Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.05 % y azul G de Coomasie (SERVA) 25 mg/l.
- 2) Amortiguador Inferior (Anódico): Tris-HCl 0.2 M (pH 6.8)

### C) Geles de segunda dimensión.

Los geles de segunda dimensión fueron utilizados para asegurar la ausencia de cualquier efecto producido por el azul G de Coomasie (contenido en el amortiguador de corrida de los geles preteñidos) en la migración de las subunidades de bajo peso molecular del complejo bc<sub>1</sub>. De acuerdo a lo anterior, los geles fueron realizados como en los casos anteriores siguiendo la técnica reportada por Schägger y col (1986).

En los geles para la primera dimensión se cargaron 20 µg de proteína en cada carril y se dejó migrar el gel a 100 V por una noche a temperatura ambiente utilizando el mismo amortiguador superior (catódico) que el utilizado en el inciso B). Posteriormente, se cortó uno de los carriles que contenían a la proteína obtenida de la primera dimensión y se incubó durante 2 h con un amortiguador que contenía: SDS 25 %, glicerol 10 %, Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8), DTT a una concentración final de 10 mM y β-mercaptoetanol a una concentración final del 5 % con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se dejó correr la proteína (contenida en el carril de este gel) en una segunda

dimensión utilizando un amortiguador superior sin azul G de Coomasie. Este último fue fijado y teñido posteriormente con la misma técnica y una vez analizado se observó que no existe ninguna variación, por lo menos en estas condiciones, en la migración de las subunidades de bajo peso molecular.

#### **4. Prueba de ELISA para la caracterización de anticuerpos.**

Se incubó el antígeno (en este caso 20 µg del complejo bc, puro delipidado y sin delipidar) en cada uno de los pozos de las placas para ELISA durante una noche a 4 °C con agitación rotatoria suave. Posteriormente, se lavaron los pozos dos veces con el amortiguador PBS [NaCl 136 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.14 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM (pH 7.4)] a temperatura ambiente durante 15 min y se incubaron el resto del día con el mismo amortiguador conteniendo albúmina sérica de bovino 3 % y azida de sodio 0.02 % (I) con el fin de bloquear los sitios inespecíficos.

Se repitieron los lavados con el amortiguador PBS dos veces durante 15 min en cada caso y se hizo reaccionar cada pozo con el anticuerpo correspondiente (Inmunoglobulinas G completas (IgG) o fragmentos Fab) en diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-11</sup> en el amortiguador I durante una noche a 4 °C con agitación suave.

Al siguiente día se repitieron los lavados y se incubó con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:3000) durante 2 h con agitación suave.

Finalmente, se incubó la placa con una solución alcalina de dietanolamina 10 mM y

cloruro de magnesio 0.5 mM para después agregar el sustrato (p-nitro fenil fosfato) el cual produce la coloración característica medida en el lector de ELISA a 405 nm.

### **5. Purificación de Inmunoglobulinas G.**

La muestra obtenida de la precipitación al 40 % con sulfato de amonio que contenía a los anticuerpos específicos para cada subunidad, se dializó contra 2 litros del amortiguador PBS sin KCL y NaCl durante una noche con el fin de eliminar el contenido de sales de amonio. Posteriormente, se sometió a una cromatografía en una columna de proteína-G unida a Sefarosa 4B, equilibrada con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM (pH 7.0) y se eluyó con un amortiguador de glicina-HCl 0.1 M (pH 2.7) neutralizando las muestras rápidamente con Tris (pH 8.0) para evitar su inactivación. Las muestras eluidas que contenían a las inmunoglobulinas G (IgG), mostraron un pico de absorción a 280 nm por lo que fueron concentradas y separadas en alícuotas. La pureza de las inmunoglobulinas fué confirmada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

### **6. Producción de fragmentos Fab.**

La obtención de los fragmentos Fab se llevó a cabo por medio de la digestión de las IgG específicas para las subunidades V y VI del complejo bc, con papaína inmovilizada. La metodología utilizada se divide en dos partes:

### 1) Lavado de la papaína immobilizada.

Se añadieron 4 ml del amortiguador de digestión ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM, cisteína-HCl 20 mM y EDTA- $\text{Na}_4$ , 10 mM) a 0.5 ml de papaína immobilizada mezclando suavemente con el fin de lavar a la enzima. Posteriormente, se separó el amortiguador por centrifugación y se repitió el lavado dos veces más desechando en cada caso el sobrenadante. Finalmente la papaína immobilizada se resuspendió en 0.5 ml del amortiguador de digestión quedando lista para la digestión de las IgG.

### 2) Generación de los fragmentos Fab.

Se añadió 0.5 ml del amortiguador de digestión a 0.5 ml de IgG previamente dializadas contra un amortiguador de:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM y EDTA 10 mM (pH 7.0). Posteriormente esta mezcla se combinó con un tubo que contenía a la papaína immobilizada incubando 5 h en un baño con agitación vigorosa a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se separó a la papaína de la muestra por centrifugación, añadiendo previamente al digerido Tris-HCl 10 mM (pH 7.5). El sobrenadante obtenido, el cual contiene a las IgG digeridas y no digeridas, se pasó por una columna de proteína A immobilizada en la cual quedaron retenidos los fragmentos Fc de cada IgG obteniendo en el primer volumen una fracción enriquecida de fragmentos Fab cuantificada a 280 nm espectrofotométricamente. La digestión de las IgG fué confirmada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

## 7. Delipidación del complejo bc<sub>1</sub>.

Para la delipidación del complejo se siguieron dos metodologías:

1) De acuerdo a la técnica reportada por Yu y Yu (1980), el complejo bc<sub>1</sub> purificado se diluyó hasta una concentración de 10 mg/ml con un amortiguador que contenía: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM/colato de sodio 0.5 % (pH 7.4) y se dejó incubar a 0 °C durante 20 min. Posteriormente se llevó al 45 % de saturación con sulfato de amonio y se centrifugó durante 20 min a 17,000 rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en un amortiguador que contenía NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, colato de sodio 0.5 % y glicerol 20 % (pH 7.4) y se llevó a una concentración de proteína de 10 mg/ml. El tratamiento con sulfato de amonio saturado se repitió tres veces más y el último precipitado obtenido (el cual contenía al complejo bc<sub>1</sub> delipidado) se disolvió en una mezcla de Tris-HCl 50 mM/sacarosa 0.67 M (pH 7.8) y se guardó a -70 °C.

2) Se llevó a cabo la delipidación por medio de la acción de un "coctel" de las fosfolipasas A<sub>2</sub>, B, C y D de acuerdo a la técnica reportada por Yu y Yu (1980): El complejo bc<sub>1</sub> se llevó a una concentración de 1 mg/ml con un amortiguador que contenía Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM y colato de sodio 0.5 % (pH 7.4) y se dejó incubar con las fosfolipasas (contenidas en un amortiguador de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y glicerol 50 % (pH 7.4)) durante 1 h a 23 °C. Una vez realizado lo anterior, se paró la reacción de fosfolipasas con EDTA 3.5 mM y la muestra obtenida se utilizó inmediatamente para medir su actividad en ausencia de fosfolípidos o adicionando 1 mg de fosfolípidos/mg de proteína.

### **8. Preparación de fosfolípidos.**

La mezcla de lípidos empleada para la reconstitución de la actividad del complejo fué la siguiente:

Fosfatidil colina	140 mg/ml
Fosfatidil etanolamina	2 mg/ml
Cardiolipina	4 mg/ml

Dicha mezcla está basada en la composición de fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial (Capaldi, 1982).

Esta mezcla se evaporó con nitrógeno y se disolvió en el amortiguador PBS quedando a una concentración de 10 mg/ml. Posteriormente se sonicó aproximadamente 15 veces con pulsos de 15 segundos y descansos de 10 seg hasta obtener una mezcla translúcida la cual fué guardada en alícuotas a -70 °C.

### **9. Medición de la actividad del complejo bc<sub>1</sub>.**

La actividad del complejo bc<sub>1</sub>, delipidado y sin delipidar fué medida espectrofotométricamente siguiendo la reducción catalizada del citocromo c de caballo, así como la reducción química de éste sustrato. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de doble haz DW-2a UV/VIS, AMINCO a las longitudes de onda de 540 y 550 nm (modo dual) (en las cuales el citocromo c reducido muestra su pico de absorción) de la siguiente manera:

**A)** La medición de la actividad del complejo bc<sub>1</sub> delipidado y sin delipidar fué llevada a cabo incubando 20 µg del complejo durante 20 min a temperatura ambiente en el amortiguador PBS que contenía: albúmina sérica de bovino 0.1 %, glicerol 1 %, colato de sodio 0.1 % y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM . Posteriormente se le adicionó a la mezcla 45 µg de los fosfolípidos para llevar a cabo su reconstitución y se dejó incubar 10 min a la misma temperatura. Posteriormente, se procedió a medir la actividad utilizando como reductor un análogo de la quinona (el 2,3-dimetoxi 5-metil 6-decil, 1,4-benzoquinona (DBH<sub>2</sub>)) a una concentración final de 15 µM para iniciar la reacción y como aceptor citocromo c de caballo oxidado a una concentración final de 30 µM.

**B)** La actividad residual del complejo delipidado fué medida en las mismas condiciones que en **A)**, pero en presencia de los anticuerpos e inmunoglobulinas G específicos para las diferentes subunidades del complejo a concentraciones crecientes, agregándolos en la primera incubación y posteriormente reconstituyendo con la misma mezcla de fosfolípidos. Este método también se utilizó para la medición de actividad en presencia de los fragmentos Fab obtenidos para las subunidades V y VI.

**C)** La inhibición aditiva de la actividad del complejo se realizó de la misma forma que en **A)**, sólo que después de incubar con el anticuerpo correspondiente, se adicionó un segundo anticuerpo y posteriormente se llevó a cabo la reconstitución del complejo con la misma mezcla de fosfolípidos.

**D)** La actividad residual del complejo medida a diferentes temperaturas se realizó de

la misma manera que en A), sólo que las incubaciones correspondientes fueron llevadas a cabo a 0, 4, 25 y 35 °C.

E) La actividad residual fué también medida a diferentes concentraciones finales de fosfolípidos (10, 20 y 30 mg/ml) en las mismas condiciones que en A).

F) La reducción química de la reacción fué medida en ausencia del complejo bc, con el análogo de quinona DBH<sub>2</sub> y el citocromo c de caballo a las mismas concentraciones y en el mismo amortiguador descrito en A).

#### **10. Reducción del 2,3-dimetoxi 5-metil 6-decil, 1,4 benzoquinona (DBH<sub>2</sub>).** (Trumpower y Edwards, 1979)

Se disolvieron 100 mg de DBH<sub>2</sub> en 1 ml de etanol absoluto en un tubo de vidrio y se llevaron a un volumen final de 5 ml de etanol. Posteriormente se le agregó 5 ml de agua y se agitó vigorosamente adicionando ditionita hasta que la mezcla se tornó color amarillo paja.

Para asegurar la reducción del análogo de quinona, se adicionó una pizca de borohidruro de sodio y se agitó vigorosamente. Se llevó a cabo la extracción del DBH<sub>2</sub> adicionando 2 ml de ciclohexano y dejando reposar. Una vez formadas las dos fases, se separó la fase superior (la cual contenía al DBH<sub>2</sub> reducido) y se le agregó de nuevo ciclohexano, para llevar a cabo la misma extracción dos veces más. Finalmente, las fases superiores extraídas se reunieron y se evaporaron a sequedad bajo un flujo de nitrógeno. La quinona reducida se disolvió en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO)



acidificado en presencia de HCL 0.1 mM y se guardó a -70 °C.

#### 11. Caracterización espectrofotométrica del complejo bc<sub>1</sub>.

Las mediciones realizadas para la obtención de los espectros diferenciales del complejo bc<sub>1</sub> puro delipidado y sin delipidar, fueron hechas en un espectrofotómetro UV 160 U SHIMADZU de la siguiente manera:

Se colocaron 25 µg del complejo bc<sub>1</sub> puro en una celda de cuarzo que contenía 1000 µl de un amortiguador de: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM y EDTA 0.25 mM (pH 7.2). Se añadió ferricianuro de potasio a una concentración final de 0.5 mM y se realizó la línea base del complejo oxidado medida en un rango de absorbancia entre 450 y 600 nm. Posteriormente, se añadió ascorbato de una solución 1 M (pH 7.0) de manera que se tuviera una concentración final de 5 mM en la celda, obteniéndose así la reducción del citocromo c<sub>1</sub>, mostrada por medio de la aparición de un pico de absorción a 553 nm cuyo coeficiente diferencial de extinción molar (553-540) es de 17.5 mM<sup>-1</sup> (Degli Esposti, 1986).

Con la mezcla anterior se obtiene una segunda línea base y se le añade ditionita para obtener la reducción total del complejo bc<sub>1</sub>. Esta reducción es evidenciada por un pico de absorción a 562 nm atribuido al hemo tipo b cuyo coeficiente diferencial de extinción molar (562-575) es de 25 mM<sup>-1</sup> (Degli Esposti, 1986).

## **12. Purificación de la subunidad VIII del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial.**

El complejo bc<sub>1</sub> puro se mezcló con una solución digestora que contenía: SDS 10 %, glicerol 30 %, Tris-HCl 100 mM (pH 6.8) y azul de bromofenol 0.3 %. La mezcla se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS de aproximadamente 50 x 40 cm con un amortiguador catódico compuesto de: azul de Coomassie G (Serva) 25 mg/l, SDS (Serva) 0.05 %, Tris 0.1 M y tricina 0.1 M (pH 8.15), de modo que la separación de las subunidades fuera evidenciada durante el tiempo de corrida (Schägger y Von Jagow, 1988). Cada carril del gel contenía 80 µg de proteína pura y el gel se dejó correr aproximadamente 3 días a 100 V.

Una vez obtenida la separación de todas las subunidades del complejo, se cortó la banda que contenía a la subunidad VIII y se transfirió a una membrana de Inmobilon (polivinildifluoruro, PVDF, Millipore) durante 4 hr a 250 mA con un amortiguador que contenía: Tris 25 mM/glicina 192 mM (pH 8.3) (Szewczyk y Summers, 1988).

Posteriormente se eluyó a la proteína contenida en la membrana con una mezcla de SDS 2 %, TX 100 1 % y Tris 25 mM (pH 8.5) incubando durante dos días completos con agitación suave. La muestra obtenida en el amortiguador de elución se liofilizó y se solubilizó en una mezcla de acetona anhídrido-trietilamina- acético-agua (85:5:5) en un volumen final de 5 ml para extraer el SDS (Konigsberg y Henderson, 1983). Finalmente se incubó ½ h en hielo y se centrifugó 5 min a 5,000 rpm. El precipitado se resuspendió en una solución de urea 1 M y Tris 25 mM (pH 8.0) para posteriormente determinar su concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Markwell y col (1978).

### **13. Diseño de un péptido sintético de la subunidad VIII.**

Aprovechando que la secuencia de aminoácidos para la subunidad VIII había sido anteriormente reportada (Wakabayashi y col, 1982), se decidió someterla a un análisis de estructura para detectar las regiones más antigénicas, con el fin de diseñar un péptido sintético que facilitara la obtención de anticuerpos. Este tipo de análisis fué llevado a cabo por medio de un algoritmo con el cual se obtuvo el grado de hidrofiliidad de la secuencia y por lo tanto el fragmento que teóricamente sería el más antigénico (Programa PC-GENE, algoritmo de Hopp y Woods, 1981). De esta forma, se obtuvo la siguiente secuencia: GDPKEEEEEEL-amida, la cual fué sintetizada por la casa comercial "Multiple Peptides Systems" (San Diego, California 92121, USA) y purificada por HPLC.

### **14. Acoplamiento del péptido sintético a acarreadores.**

El acoplamiento del péptido a albúmina o hemocianina se llevó a cabo siguiendo las dos metodologías que a continuación se describen:

**1)** 10 mg del acarreador con 10 mg del péptido, se llevaron a 1 ml de amortiguador PBS y se sonicaron ½ h. Posteriormente, se les añadió glutaraldehído al 25 % y se incubaron una noche con agitación suave. Finalmente se dializaron 4 h contra el amortiguador PBS y se guardaron en alicuotas.

**2)** Se agregó 0.5 ml de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil carbodimida hidrocioruro 0.33

M a 1 ml del péptido (10 mg/ml) y se ajustó el pH a  $4.5 \pm 0.5$  con HCl 0.1 N. Se agitó 5 min a temperatura ambiente y se le agregó 0.5 ml del acarreador (21 mg/ml), se agitó a temperatura ambiente por 4 h y se paró la reacción con 0.2 ml de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0). Finalmente el péptido acoplado se dializó contra el amortiguador PBS y se guardó en alícuotas.

### **15. Obtención de anticuerpos policlonales.**

Para obtener los anticuerpos específicos contra la proteína pura de interés o contra el péptido sintético solo o acoplado a acarreadores, se llevaron a cabo dos metodologías:

1) Se inyectó intramuscularmente 100  $\mu\text{g}$  de la proteína contenida en una mezcla con 1 ml de adyuvante completo de Freund en conejos hembra de aproximadamente 1½ kg de peso. Después de tres semanas, se realizaron dos refuerzos con la mitad de la concentración de proteína inicial contenidos en 1 ml de adyuvante incompleto de Freund, dejando el mismo tiempo de espera entre cada refuerzo y/o

2) Se realizaron 10 inyecciones subdérmicas en el dorso del conejo previamente limpio (Zelesna y col, 1992) cada una con 0.1 ml de una mezcla que contenía 10  $\mu\text{g}$  de proteína con adyuvante completo de Freund. Después de tres semanas se realizó un refuerzo con la mitad de la proteína inicialmente empleada acompañada del adyuvante incompleto.

Transcurridos los tiempos de refuerzo para cada caso, se extrajeron 20 ml de sangre los cuales una vez formado el coágulo, se centrifugaron de 30-40 min a 15,000 rpm. El

sobrenadante obtenido. el cual contiene la fracción de inmunoglobulinas, se precipitó dos veces con sulfato de amonio (al 70 y 40 %) y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm en cada caso. Finalmente la porción enriquecida en anticuerpos (40 %) se resuspendió en el amortiguador PBS y se verificó la reacción antígeno-anticuerpo tanto por inmunorélicas tipo Western como por la prueba de ELISA.

#### **16. Inmunorélicas Tipo Western. (Hawakes y col 1982; Towbin y col 1979)**

Se realizaron geles de poliacrilamida-SDS de los cuales se cortaron en tiras las partes de interés y se incubaron con un amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % y SDS 0.1 %) durante 30 min a temperatura ambiente.

Por otra parte, se colocó en la rejilla una esponja mojada con el mismo amortiguador, encima un papel filtro mojado, las tiras del gel sobre el papel filtro y encima la membrana de nitrocelulosa. Esta se cubrió a su vez con otro papel filtro y esponja mojados. Se cerró la rejilla y se colocó en una cámara que contenía el amortiguador descrito y se dejó transferir a 250 mA durante 4 h con agitación.

Posteriormente se sacaron las membranas de nitrocelulosa que contenían a la proteína de interés y se lavaron con amortiguador TBS (Tris-HCl 20 mM y NaCl 0.5 M pH 7.5) durante 5 min con agitación suave dos veces. Se bloquearon los sitios inespecíficos con una mezcla de TBS y gelatina al 3 % durante 5 h, después de lo cual se lavaron dos veces con el amortiguador TTBS (TBS conteniendo Tween-20 0.05 %) para después agregar el anticuerpo a probar en una solución de TTBS y gelatina 1 %.

Se incubaron 5 h con agitación suave y se les agregó un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Biorad) en una solución de TTBS con gelatina 1 % y agitándose durante 5 h. Las membranas se lavaron dos veces con TTBS durante 5 min y se les agregó una solución alcalina de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M y  $\text{MgCl}_2$  1 mM (pH 9.8). La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con 5-Bromo 4-Cloro-3-Indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT). Finalmente se lavaron las membranas con agua bidestilada y se guardaron en la oscuridad hasta ser fotografiadas.

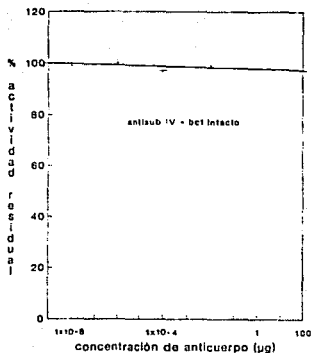
## **IV. RESULTADOS.**

### **1. Ausencia de Inhibición por anticuerpos en el complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial intacto.**

Tomando en cuenta que uno de los objetivos del presente trabajo se refiere a explorar cuál es la participación de algunas de las subunidades en el complejo bc<sub>1</sub>, por medio de la reacción con anticuerpos específicos, se realizaron diferentes incubaciones del complejo con los anticuerpos específicos contra las subunidades de alto peso molecular (subunidades I, II, III, IV, V y VI) por separado, interpretando la inhibición de la actividad obtenida del complejo después de dicha incubación, como el resultado de un bloqueo provocado por la interacción antígeno-anticuerpo. Los resultados mostrados en la **Figura 11** indican que no existe ningún tipo de inhibición provocado por tales anticuerpos. De acuerdo a lo anterior se procedió a eliminar a los fosfolípidos que contenía el complejo bc<sub>1</sub> puro intacto ya que muy probablemente impiden la interacción antígeno-anticuerpo según los datos reportados por Yu y Yu (1980). La eliminación de los fosfolípidos se llevó a cabo por dos métodos: la precipitación con sales de amonio y la incubación con fosfolipasas.

### **2. Integridad y actividad del complejo bc<sub>1</sub> delipidado.**

El tratamiento de delipidación por precipitación con sales de amonio y por acción de fosfolipasas son métodos drásticos para la eliminación de los fosfolípidos contenidos en



**Figura 11.** Por ciento de la actividad específica residual del complejo bc, puro intacto medida en presencia de concentraciones crecientes (en µg) de anticuerpos específicos para la subunidad IV (citocromo c). El 100 % de la actividad corresponde a 4.56 µmolas de cit c reducido/mir/mg de proteína.

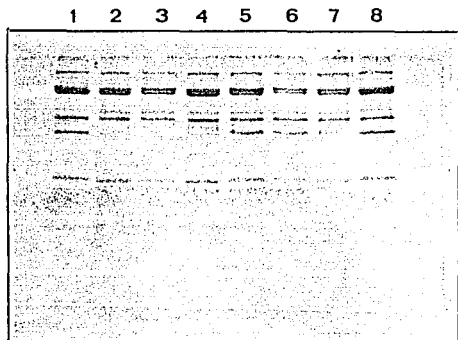
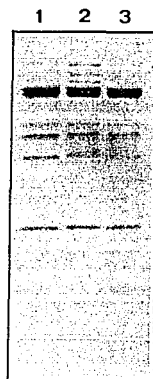


la preparación del complejo bc<sub>1</sub> puro de corazón de bovino: el primero porque puede desnaturar parcialmente al complejo y el segundo por la posibilidad de contaminación por proteasas en la mezcla de fosfolipasas. De acuerdo a lo anterior, se realizaron electroforesis con 20 µg del complejo delipidado por ambos métodos de acuerdo al método descrito por Schägger y Von Jagow (1987) utilizando geles de poliacrilamida al 16 % en presencia de SDS teñidos con azul G de Coomassie, con el fin de comprobar si realmente éstas preparaciones no mostraban ninguna diferencia en el contenido de subunidades.

Con el gel de la **Figura 12 A** se pudo comprobar que a medida que se incrementó el número de precipitaciones con sales de amonio, el contenido de subunidades no se vió alterado significativamente. Por otra parte en la **Figura 12 B** se comparó al complejo delipidado por precipitaciones con sales de amonio con el obtenido después del tratamiento con fosfolipasas y con el complejo sin delipidar, utilizando las mismas concentraciones de cada complejo. Se observó que no existe ninguna diferencia significativa en la composición polipeptídica, sin embargo, se decidió probar la actividad del complejo delipidado (con 50 µg de proteína en cada ensayo) después de cada uno de los pasos de precipitación.

La **Tabla 2** muestra los resultados de la actividad residual obtenida para el complejo bc<sub>1</sub> después de cada paso de precipitación con sales de amonio.

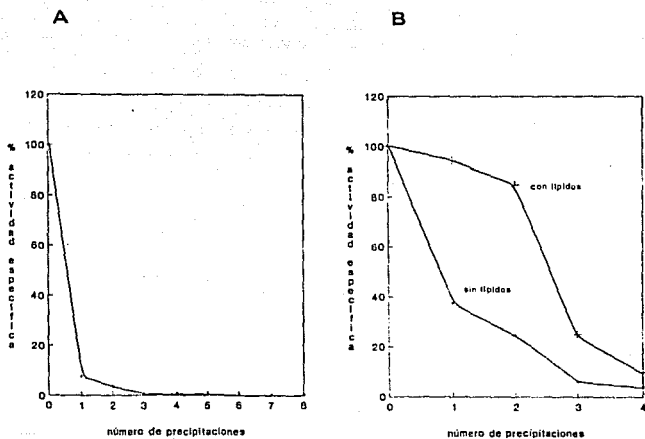
Con los resultados obtenidos en la **Figura 13 A**, utilizando una muestra de complejo diferente a la mostrada en la **Tabla 2**, fué evidente que a partir de la tercera precipitación, la actividad residual del complejo delipidado por medio de precipitaciones

**A****B**

**Figura 12 A.** Comparación del patrón electroforético del complejo bc, de corazón de bovino en gels de poliacrilamida-SDS al 16 % con respecto al aumento en el número de precipitaciones con sales de amonio. Cada número de carril corresponde al número de precipitación realizada, y **B.** comparación del patrón electroforético del complejo bc, intacto (carril 1), delipidado con sales de amonio (carril 2) y delipidado con fosfolipasas (carril 3).

Actividad control del complejo bc <sub>1</sub> puro	Número de precipitaciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2.27 (100%)	0.981 (43.2)	0.566 (24.9)	0.182 (8.0)	0.142 (6.25)	0.117 (5.15)	0.022 (0.96)	0.014 (0.61)	0.008 (0.35)
1.91 (100%)	0.990 (51.8)	0.600 (31.4)	0.164 (8.58)	0.155 (8.11)	0.106 (5.55)	0.015 (0.78)	0.014 (0.73)	0.010 (0.52)

**Tabla 2.** Actividad residual del complejo bc<sub>1</sub> puro medida por duplicado en diferentes grados de precipitación con sales de amonio. ( $\mu$ mol de cit c reducido/mln/mg de proteína).

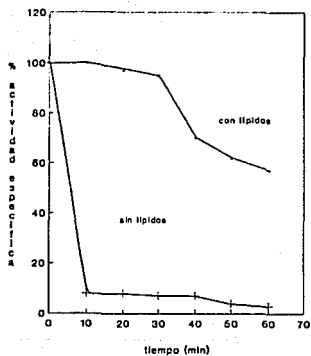


**Figura 13 A.** Porcentaje de la actividad específica residual del complejo  $bc_1$  medida con respecto al número de precipitaciones con sulfato de amonio realizadas y **B.** medida después de reconstituir con fosfolípidos y sin reconstituir. La actividad correspondiente al 100 % fué de 2 y 1.8  $\mu$ molas cit c red/min/mg de proteína respectivamente.

con sales de amonio, se reduce a un 0.6 % oscilando en este valor hasta la octava precipitación probada en la cual la actividad residual del complejo es del 0.2 %. En la **Figura 13 B** se comprobó la importancia de la reconstitución del complejo delipidado con una mezcla de fosfolípidos, ya que la actividad residual del complejo que fué reconstituido mostró ser substancialmente mayor en comparación con el complejo que nó se reconstituyó.

Estos resultados también fueron corroborados con la preparación del complejo que fué delipidado por medio de la acción de una mezcla de fosfolipasas (**Figura 14**). En este caso, a medida que se aumentó el tiempo de incubación con estas enzimas, la actividad residual del complejo (posteriormente reconstituido con una mezcla de fosfolípidos) fué disminuyendo hasta llegar a una actividad residual del 56 % después de una hora de incubación. Como fué de esperar, la actividad residual del complejo sin reconstituir decayó drásticamente.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se realizó un espectro diferencial de la preparación del complejo sin delipidar y delipidado por ambos métodos para descartar que la disminución de la actividad fuera el resultado de un daño a nivel de los centros hémicos del complejo. De ésta forma, se obtuvo una relación de citocromo b/citocromo c, = 1.8 para el complejo delipidado por precipitaciones, de 2.0 para el complejo delipidado por fosfolipasas y de 1.88 para el complejo sin delipidar, lo cual nos indicó que el contenido hémico estaba dentro de los valores teóricos esperados, tomando en cuenta que existe una estequiometría b/c, entre 1.8 y 2.0 en las preparaciones de complejo bc, puro intacto.



**Figura 14.** Porcentaje de la actividad residual del complejo bc, delipidado medida con respecto al tiempo de incubación en presencia de una mezcla de fosfolipasas, medida después de reconstituir con fosfolípidos y sin reconstituir. La actividad correspondiente al 100 % fué de 1.3  $\mu$ molas cit c red/min/mg de proteína.

Ya que los datos de inhibición de la actividad y reconstitución del complejo fueron más altos para aquel que fué delipidado con sales de amonio, todos los experimentos subsecuentes de este trabajo fueron realizados con éste complejo.

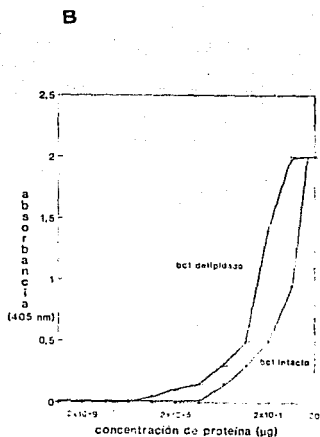
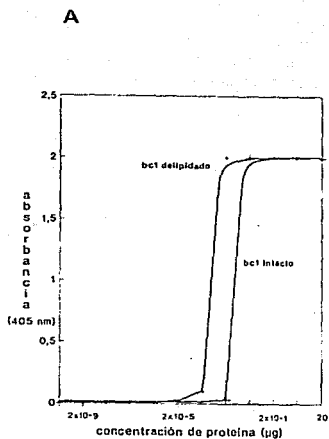
### **3. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo delipidado y sin delipidar.**

De acuerdo a los datos reportados por el grupo de Haley y col (1986), se decidió probar si la reacción antígeno-anticuerpo obtenida por medio de la prueba de ELISA (en la cual se asume que el antígeno permanece en forma nativa) era diferente para el complejo delipidado que para el complejo sin delipidar. En la **Figura 15** se puede apreciar que esta reacción resultó ser un orden de magnitud mayor para el complejo delipidado probado con dos anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra las subunidades V y VI.

### **4. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc, delipidado en presencia de seis anticuerpos monoespecíficos.**

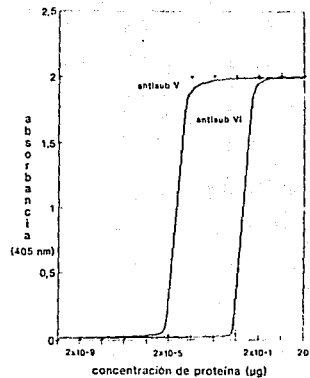
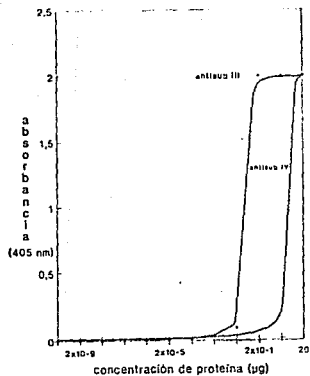
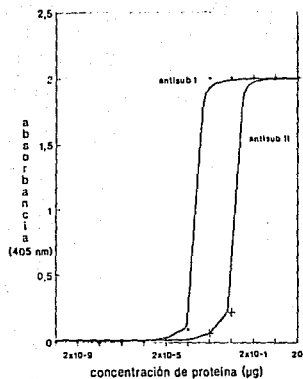
Con el fin de estudiar la participación de algunas de las subunidades del complejo en la actividad del mismo por medio de una estrategia inmunoquímica, se decidió realizar inicialmente una caracterización de seis anticuerpos (obtenidos previamente en el laboratorio) por medio de su reacción antígeno-anticuerpo tomando como herramienta la prueba de ELISA.

En la **Figura 16** se muestran los resultados obtenidos al incubar 20 µg de complejo bc, puro delipidado en contacto con concentraciones crecientes de los anticuerpos



**Figura 15.** Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc<sub>1</sub> intacto y delipidado evaluada por la prueba de ELISA y medida en presencia de concentraciones crecientes de dos anticuerpos específicos para A) la subunidad V y B) la subunidad VI.

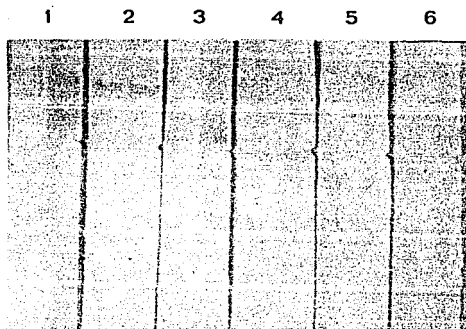




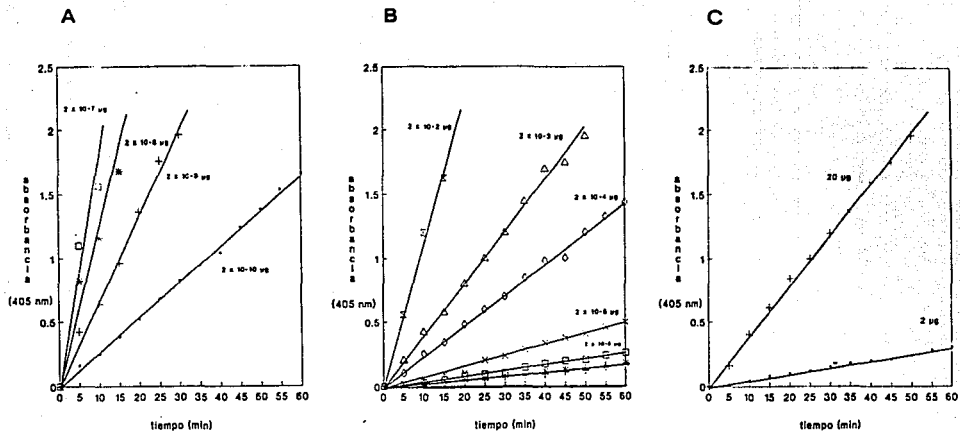
**Figura 16.** Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc<sub>1</sub> delipidado evaluada por la prueba de ELISA y medida en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos específicos contra las subunidades I, II, III (cit b), IV (cit c<sub>1</sub>), V (proteína hierro-azufre) y VI.

específicos contra las seis primeras subunidades del complejo (I, II, III, IV, V y VI, la reacción específica de estos es mostrada en la Figura 17 evaluada por la técnica de Western Blot). La reacción obtenida con el anticuerpo contra la subunidad V resultó ser la más fuerte, ya que a concentraciones muy bajas del mismo ( $8 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  de anticuerpo) se obtuvo el 50 % de la reacción antígeno-anticuerpo comparada con la de los demás anticuerpos, siguiéndole la reacción obtenida con el anticuerpo contra la subunidad estructural I con el cual el 50 % de la reacción se obtuvo con aproximadamente  $8 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ . Dichos resultados coincidieron con los obtenidos con las inmunoréplicas tipo Western, ya que estos anticuerpos pueden ser utilizados hasta en diluciones de 1:100,000 en ambos casos.

La linealidad de éste tipo de reacciones puede ser visualizada en la Figura 18. En este caso la reacción fué medida cada 5 min para una subunidad representativa de la matriz (subunidad VI) y otra representativa del espacio intermembranal (subunidad V), y para la reacción obtenida con un suero preinmune. En estas puebas se observó que el anticuerpo específico para la subunidad V tuvo una alta reacción antígeno-anticuerpo transcurridos 10 minutos de iniciada la reacción utilizando una concentración de  $1 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  de anticuerpo, siendo que en el caso del anticuerpo específico para la subunidad VI se obtiene una reacción similar pero después de una hora de iniciar la reacción. Un dato importante que se encontró fué el de la reacción obtenida con el anticuerpo proveniente de suero preinmune, ya que en nuestras condiciones experimentales se obtuvo una reacción antígeno-anticuerpo a altas concentraciones del mismo (20 y 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpo) indicando que todas las reacciones obtenidas con los anticuerpos contra



**Figura 17.** Inmunoréplica tipo Western en la cual se muestra la reacción obtenida con anticuerpos específicos para las seis primeras subunidades del complejo bc<sub>1</sub>. En todos los carriles se cargaron 40 µg de proteína. Cada carril fué decorado con los sueros específicos contra las siguientes subunidades: Carril 1: Sub I, 2: II, 3: III (cit b), 4: IV (cit c<sub>1</sub>), 5: V (proteína hierro-azufre) y 6: VI.



**Figura 18.** Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc, delipidado con respecto al tiempo de la reacción, evaluado por la prueba de ELISA y medida en presencia de concentraciones crecientes (en  $\mu\text{g}$ ) de anticuerpos específicos para **A)** la subunidad V, **B)** VI y **C)** suero preinmune.

las subunidades del complejo a altas concentraciones son inespecíficas.

##### **5. Caracterización de la actividad del complejo bc, delipidado en presencia de seis anticuerpos específicos.**

Para estudiar cuál sería la participación de las seis subunidades de alto peso molecular en la actividad del complejo bc, se realizaron pruebas de actividad en presencia de cada uno de los anticuerpos específicos, bloqueando a cada una de las subunidades en el complejo en forma independiente, con las mismas concentraciones crecientes utilizadas en las pruebas de ELISA.

Las actividades fueron medidas a 25 °C, ya que después de probar tres temperaturas de incubación (4, 25 y 35°C), fué en estas condiciones donde se obtuvieron las actividades más altas. Las actividades que se grafican fueron las actividades residuales obtenidas después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos.

Como se muestra en la **Figura 19**, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**1)** En los seis casos probados, la actividad del complejo disminuyó a bajas concentraciones del anticuerpo correspondiente, posteriormente se estabilizó en un rango en el cual no se observaron variaciones significativas y finalmente decreció una vez más a altas concentraciones de cada anticuerpo.

**2)** En el resultado obtenido para el anticuerpo específico contra el citocromo b (subunidad III), se observó que aún utilizando bajas concentraciones del anticuerpo la actividad del complejo se inhibió significativamente hasta llegar a un 35 % de actividad

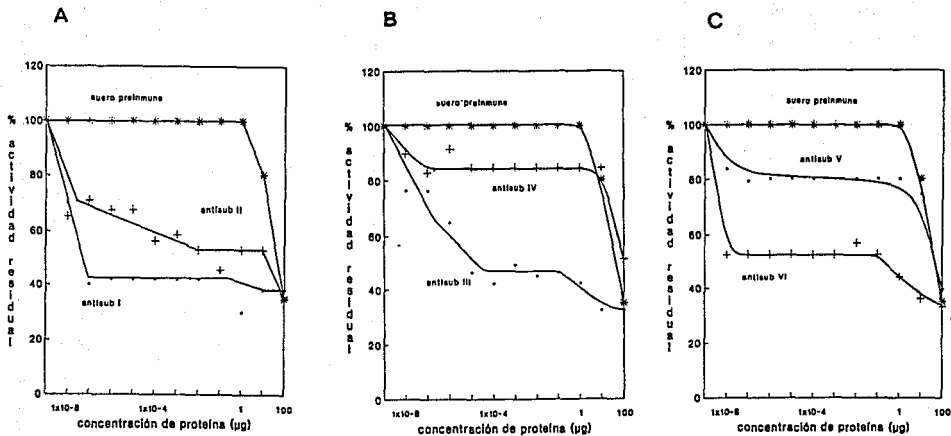


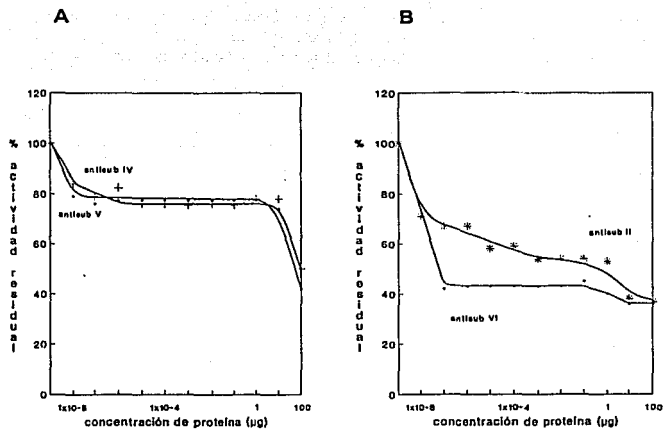
Figura 19. Porcentaje de la actividad residual del complejo bc, delipidado medida en presencia de concentraciones crecientes (en µg) de anticuerpos específicos contra A) las subunidades I, II, B) III (cit b), IV (cit c), C) V (proteína hierro-azufre), VI y suero preinmune después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos. El 100 % de la actividad en cada caso corresponde a 0.1, 0.095, 0.08, 0.07, 0.09 y 0.075 µmolas de cit c red/min/mg de proteína respectivamente.

residual (65% de inhibición) con 100 µg de anticuerpo. Este resultado fué obtenido únicamente para esta subunidad, lo cual confirma su importante participación en la actividad del complejo.

3) En lo que se refiere a los resultados obtenidos utilizando anticuerpos específicos contra las subunidades I y VI, se observó que la actividad del complejo se inhibió un 58 y 48 % respectivamente utilizando bajas concentraciones de anticuerpo ( $1 \times 10^7$  µg).

4) En todos los casos la inhibición mayor de la actividad fué obtenida entre los 10 y 100 µg de anticuerpo, sin embargo es importante mencionar que a estas mismas concentraciones los anticuerpos obtenidos de un suero preimmune dan la misma inhibición de la actividad del complejo. Por lo tanto, los resultados obtenidos a estas concentraciones no se consideraron inhibiciones específicas, sino más bien una inhibición por efecto estérico. De acuerdo con estos resultados se realizó una comparación entre el grado de inhibición de la actividad obtenida cuando fueron utilizados anticuerpos específicos contra subunidades ubicadas en la matriz mitocondrial (II y VI) y contra subunidades ubicadas en el espacio intermembranal (IV y V), estos resultados se muestran en la **Figura 20**.

Los resultados mostraron que el grado de inhibición obtenido utilizando anticuerpos específicos contra las subunidades ubicadas en la matriz mitocondrial fué más pronunciado aún con bajas concentraciones de los anticuerpos, obteniéndose un 35 % de actividad residual. Además se observó que dentro de éstas mismas, la reacción de



**Figura 20.** Comparación del porcentaje de la actividad residual del complejo bc<sub>1</sub> del pídido medida en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos específicos contra: (A) las subunidades ubicadas en el espacio intermembranal y (B) en la matriz mitocondrial, después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos.



inhibición con el anticuerpo específico contra la subunidad VI fué todavía mayor que la obtenida con el anticuerpo específico para la subunidad II. Sin embargo, para las subunidades ubicadas en el espacio intermembranal, se observó que la mayor inhibición se obtuvo cuando fueron utilizadas altas concentraciones del anticuerpo correspondiente.

Para comparar las concentraciones a las cuales se obtiene la mitad de la reacción en cada caso, se realizó una tabla comparativa que contiene las concentraciones de anticuerpo a la cual se obtuvo el 50 % de la reacción antígeno-anticuerpo y de actividad residual utilizando cada anticuerpo por separado (Tabla 3). En este caso se observó que las concentraciones requeridas para estas reacciones fueron diferentes en cada caso, ya que para algunos anticuerpos se necesitó menores concentraciones de anticuerpo para producir el 50 % de la actividad con respecto a la reacción antígeno-anticuerpo, tal fué el caso de la subunidad III o citocromo b en la cual se obtuvo un 50 % de inhibición de la actividad a una concentración de  $3 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}$  de anticuerpo comparada con 0.1  $\mu\text{g}$  para el caso del 50 % de reacción antígeno-anticuerpo.

El caso inverso fué obtenido para la subunidad V en donde el 50 % de la inhibición de la actividad se dió a una concentración de 60  $\mu\text{g}$  de anticuerpo y el 50 % de reacción antígeno-anticuerpo se dió a  $9 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g}$  de anticuerpo.

Sin embargo, aún cuando se obtuvieron resultados diferentes, se observó que se requieren bajas concentraciones de anticuerpo para obtener el 50 % de la reacción utilizando los anticuerpos específicos contra las subunidades expuestas hacia la matriz mitocondrial, las subunidades I, II, y VI.

Anticuerpos específicos para las sub- unidades:	A) Concentración de anticuerpo necesaria para la reacción antígeno-anticuerpo.	B) Concentración de anticuerpo necesaria para obtener el 50 % de la inhibición de la actividad del complejo.
1 (I)	$8 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-7}$
2 (II)	$5 \times 10^{-2}$	$4 \times 10^{-7}$
3 (III)	$1 \times 10^{-1}$	$5 \times 10^{-8}$
4 (IV)	10	$9 \times 10^{-9}$
5 (V)	$9 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-8}$
6 (VI)	$8 \times 10^{-2}$	$6 \times 10^{-9}$
reg. amino- terminal (sub III)	$6 \times 10^{-2}$	$6 \times 10^{-7}$
reg. carboxilo- terminal (sub III)	$8 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-7}$

**Tabla 3.** Concentración de anticuerpo (en  $\mu\text{g}$ ) a la cual se obtuvo **A)** el 50 % de la reacción antígeno-anticuerpo y **B)** el 50 % de la actividad residual del complejo bc, cuando fué incubado con concentraciones crecientes de anticuerpos dirigidos contra las subunidades de alto peso molecular del complejo bc.

#### **6. Inhibición aditiva de la actividad del complejo bc, delipidado.**

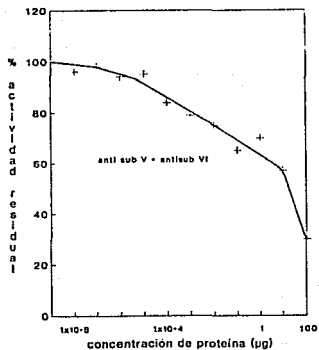
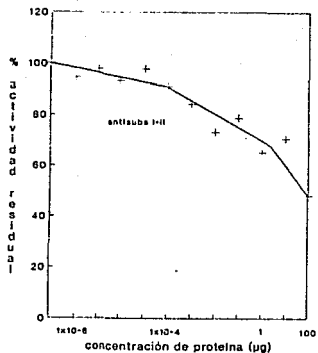
Con el fin de observar si se podría obtener una inhibición aditiva de la actividad del complejo utilizando varios anticuerpos en un mismo ensayo, se probó medir la inhibición en presencia de dos anticuerpos específicos (contra las subunidades V y VI) (Figura 21).

Los resultados obtenidos mostraron un tipo de inhibición en el cual a bajas concentraciones del anticuerpo, la actividad residual no disminuyó significativamente. Sin embargo, a medida que se aumentó la concentración del anticuerpo la inhibición de la actividad fué cada vez mayor. Este mismo resultado fué obtenido al incubar el complejo bc, delipidado en presencia de un anticuerpo específico obtenido por la inoculación en conejos de las dos subunidades de alto peso molecular juntas (subunidades I y II).

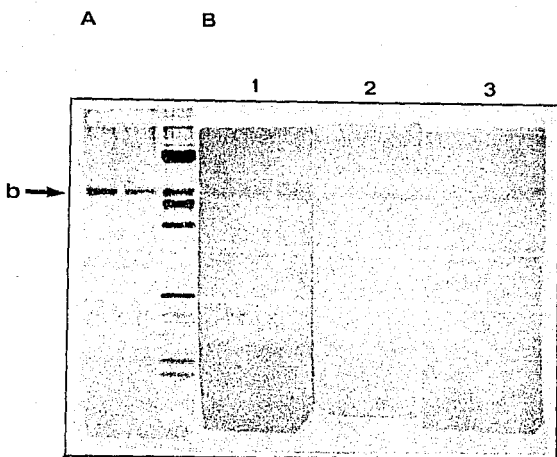
#### **7. Caracterización de la actividad del complejo bc, delipidado en presencia de anticuerpos específicos para dos péptidos sintéticos del citocromo b.**

Ya que hasta la fecha todavía no se ha identificado la ubicación correcta de la región amino terminal en la secuencia del citocromo b por estrategias inmunoquímicas, se utilizaron anticuerpos específicos contra dos péptidos sintéticos de las regiones correspondientes para el extremo amino y carboxi-terminal del citocromo b puro para probar si la actividad del complejo bc, era afectada por el bloqueo de estas regiones y dar así una evidencia de la posible ubicación de las mismas.

La reacción específica para estas regiones es mostrada en la Figura 22 en la cual se obtiene la aparición de una banda para el citocromo b en presencia de los anticuerpos



**Figura 21.** Porcentaje de la actividad residual del complejo bc, delipidado medida en presencia de concentraciones crecientes de dos anticuerpos específicos para las subunidades V y VI agregados a la mezcla de reacción en tiempos diferentes comparados con el porcentaje de la actividad residual obtenido con las mismas concentraciones de un anticuerpo específico para las dos primeras subunidades juntas (I+II). El 100 % de la actividad en cada caso corresponde a 0.1 y 0.09  $\mu\text{mol}$  de cit c reducido/min/vmg de proteína respectivamente.



**Figura 22** A. Patrón electroforético del complejo bc, intacto en un gel de poliacrilamida-SDS al 16 % teñido con azul G de Coomassie en el cual se muestra al citocromo b purificado y B. Inmunoréplica tipo Western del complejo bc, en presencia de anticuerpos específicos para las regiones (1) amino y (2) carboxilo-terminal del citocromo b así como para (3) en presencia de un anticuerpo generado contra la subunidad completa (citocromo b).

anti amino y carboxilo-terminal evaluado por la técnica de inmureplicas tipo Western.

Como se muestra en la Figura 23, la actividad del complejo en presencia del anticuerpo específico contra la región amino-terminal presentó una disminución significativa tomando en cuenta que a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  de anticuerpo, se obtuvo un 45 % de inhibición de la actividad.

Llevando a cabo este mismo tipo de experimentos pero ahora en presencia del anticuerpo específico contra la región carboxi terminal, se observó que la disminución en el porcentaje de actividad es muy baja ya que a la misma concentración de anticuerpo que en el caso anterior, la actividad se inhibió solamente en un 10 %. Sin embargo si estos resultados son comparados con aquellos obtenidos por un anticuerpo contra el citocromo b completo, se puede observar que la inhibición de la actividad a esa misma concentración es el doble de la obtenida por los anticuerpos anteriormente descritos, sin embargo, es importante tomar en cuenta que los anticuerpos específicos contra las regiones amino y carboxi-terminal realmente están reaccionando como anticuerpos que para fines prácticos pueden actuar como "monoclonales" ya que están reconociendo una pequeña secuencia de 11 residuos de aminoácidos, por lo que la reacción obtenida en estos ensayos puede considerarse altamente específica.

Una comparación del 50 % de inhibición de la actividad del complejo y de la reacción obtenida por la prueba de ELISA en presencia de estos anticuerpos se presentada en la Tabla 3.

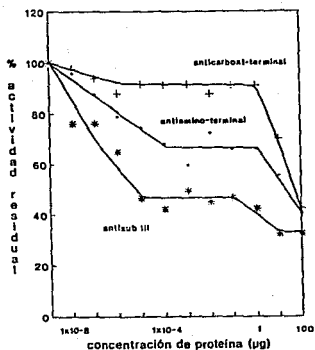


Figura 23. Porcentaje de la actividad residual del complejo bc<sub>1</sub> delipidado medida después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos específicos contra las regiones amino y carboxilo-terminal del citocromo b en comparación con la actividad residual obtenida con un anticuerpo específico contra el citocromo b completo. El 100 % de la actividad en el caso de los anticuerpos dirigidos contra las regiones amino y carboxilo-terminal del cit b corresponde a 0.16 y 0.08  $\mu$ molas de cit c reducido/mir/mg de proteína respectivamente.

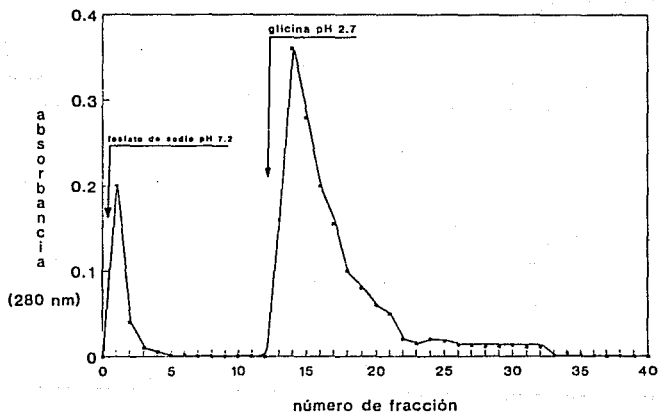
#### 8. Obtención de inmunoglobulinas G puras específicas para dos subunidades del complejo bc<sub>1</sub> puro.

Para demostrar que son las inmunoglobulinas tipo G (IgG) las únicas que están dando la reacción de unión antígeno-anticuerpo y la inhibición de la actividad del complejo, se llevó a cabo la purificación de éstas a partir de una preparación precipitada al 40 % con sales de amonio que contenía a los anticuerpos específicos. Esta purificación se llevó a cabo para los anticuerpos contra las subunidades V y VI (contra una subunidad expuesta al espacio intermembranal y otra hacia la matriz mitocondrial).

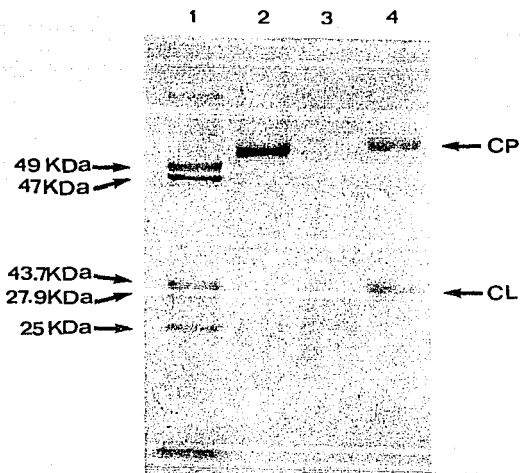
Los perfiles obtenidos de cada purificación después de cargar la muestra en una columna de sefarosa 4B proteína-G (Figura 24), mostraron el mismo comportamiento, en el cual se obtuvo un primer pico correspondiente al volumen de exclusión que contuvo proteínas del suero. Posteriormente se obtuvo un segundo pico resultado de la elución con un amortiguador de glicina (pH 2.7) la cual contuvo el volumen enriquecido en inmunoglobulinas.

En la Figura 25 se muestra un gel de acrilamida al 10 % en presencia de SDS en el cual se observan las muestras tanto del volumen de exclusión como de las IgGs puras, éstas últimas como dos bandas de alto y bajo peso molecular correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Como marcadores de pesos moleculares se utilizó una muestra del complejo bc<sub>1</sub> puro de corazón de bovino.





**Figura 24.** Perfil de elución obtenido para la columna de Sefarosa 4B acoplada a proteína G en donde se muestra la purificación de inmunoglobulinas G (IgG) específicas contra el citocromo  $c_1$  (subunidad IV) del complejo bc, mitocondrial.



**Figura 25.** Gel de poliacrilamida-SDS al 10 % en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el cual se muestra el patrón electroforético obtenido para las inmunoglobulinas G puras. Carril 1: complejo bc, intacto como marcador de pesos moleculares; 2: fracción obtenida en el volúmen de exclusión; 3: sobrenadante obtenido después de precipitar con ácido tricloroacético y 4: boton obtenido de la misma precipitación enriquecido en IgG puras; CP: cadenas pesadas (50 KDa) y CL: cadenas ligeras (25KDa).

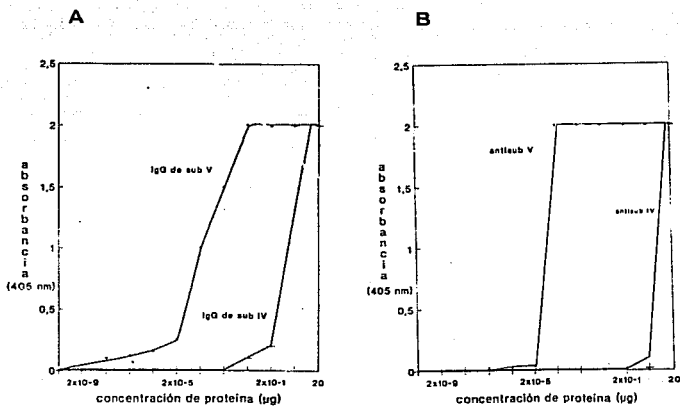
**9. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc, delipidado en presencia de inmunoglobulinas G puras específicas contra dos subunidades.**

La reacción antígeno-anticuerpo con IgG puras fué medida de acuerdo a la técnica de ELISA incubando 20 µg de antígeno (complejo bc, delipidado puro) con cantidades crecientes de cada IgG. En la **Figura 26 A**, se observó que no existe una gran variación en la reacción en comparación con la obtenida con una preparación cruda de inmunoglobulinas para las mismas subunidades ya que el 50 % de la reacción se obtuvo a 7 µg de IgG para la subunidad IV y a  $9 \times 10^{-5}$  µg para la subunidad V los cuales caen en los mismos rangos de concentración que los mostrados en la **Figura 26 B**.

**10. Obtención de fragmentos Fab generados a partir de dos inmunoglobulinas puras específicas para las subunidades V y VI.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cuales se demostró que existe una inhibición de la actividad del complejo si se incubaba a éste con anticuerpos específicos contra las diferentes subunidades, se quiso comprobar si parte de esta inhibición no era un resultado del efecto estérico de las inmunoglobulinas, ya que su peso molecular es de 150,000 Da tomando en cuenta las regiones Fc y Fab en donde la segunda es la responsable del reconocimiento de cualquier epítipo específico.

De esta forma, se generaron fragmentos Fab a partir de preparaciones que contenían IgGs puras específicas contra las subunidades V y VI las cuales representan a las regiones intermembranal y de la matriz mitocondrial respectivamente, así como de suero



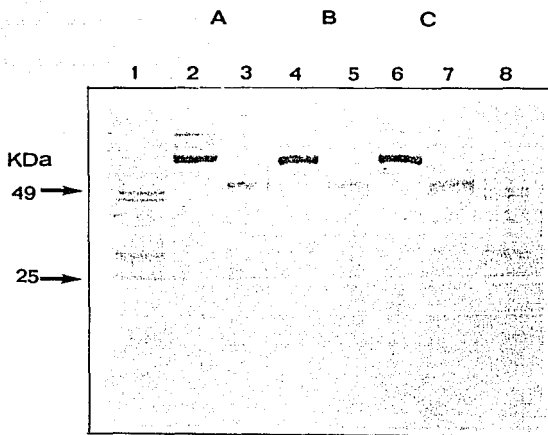
**Figura 26 A.** Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc<sub>1</sub> delipidado en presencia de concentraciones crecientes de IgG puras específicas para la subunidad IV y B. en presencia de un suero con IgG **totales**, evaluado por el método de ELISA.

preinmune para comprobar si la inhibición del complejo mostraba el mismo comportamiento. El gel realizado de acrilamida al 10 % mostrado en la **Figura 27** muestra las preparaciones de IgGs puras para cada subunidad.

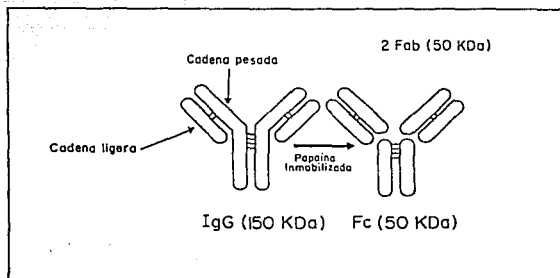
Como se describió en la metodología, los fragmentos Fab se generaron por digestión con papaína (como se muestra en el esquema de la **Figura 28**) y se obtuvieron en forma pura a partir de una columna de proteína A acoplada a agarosa en la cual quedan retenidos los fragmentos Fc libres o sin digerir. Los perfiles de elución se muestran en la **Figura 29**. El primer pico de elución obtenido es una preparación de fragmentos Fab libres; los fragmentos Fc fueron eluidos posteriormente con un amortiguador de glicina pH 2-3.

La **Figura 30 A** contiene los resultados obtenidos después de haber sometido a las muestras, tanto de fragmentos Fc y Fab puros como de IgGs sin digerir, a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en ausencia de  $\beta$ -mercapto etanol como agente reductor. La banda obtenida en el segundo carril correspondió a IgGs puras sin digerir, las cuales mostraron un peso molecular de 150,000 Da; el tercer carril mostró una banda con peso molecular aproximado de 50,000 Da, característico de la presencia de fragmentos Fab libres y por último el cuarto carril contuvo una mezcla de fragmentos Fc con IgGs sin digerir mostrada como productos de degradación.

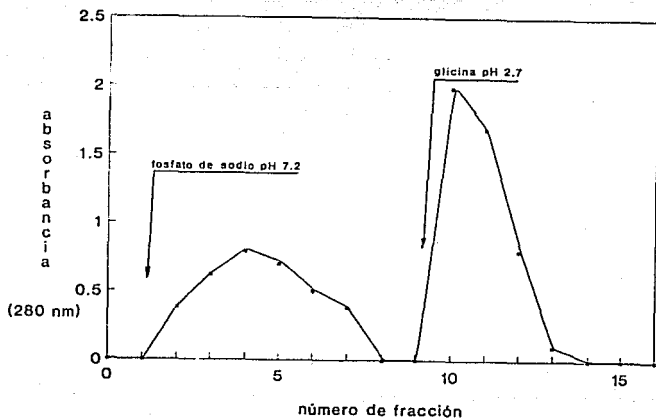
La **Figura 30 B**, muestra los resultados obtenidos al someter las mismas muestras (en éste caso de las tres preparaciones de IgGs puras específicas contra las tres subunidades) en las mismas condiciones de electroforesis solo que en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol, con el fin de reducir los puentes disulfuro contenidos en las cadenas



**Figura 27.** Gel de poliacrilamida-SDS al 10% en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el cual se muestra el patrón electroforético obtenido para IgG puras específicas para las subunidades V (A), VI (B) y suero preinmune (C). Carriles 1 y 8: complejo bc<sub>1</sub> intacto como marcador de pesos moleculares, 2, 4 y 6: volúmen de exclusión de la columna y 3, 5 y 7: fracción enriquecida en IgG puras.



**Figura 28.** Esquema que muestra la localización de los sitios en los cuales son cortadas las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas para la obtención de fragmentos Fab por medio de la acción con papaína.



**Figura 29.** Perfil de elución obtenido para la purificación de fragmentos Fab a partir de IgG puras específicas para las subunidades V (proteína hierro-azufre) y VI del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial así como para IgG puras obtenidas a partir de suero preinmune realizado en columnas de agarosa con proteína A inmobilizada.



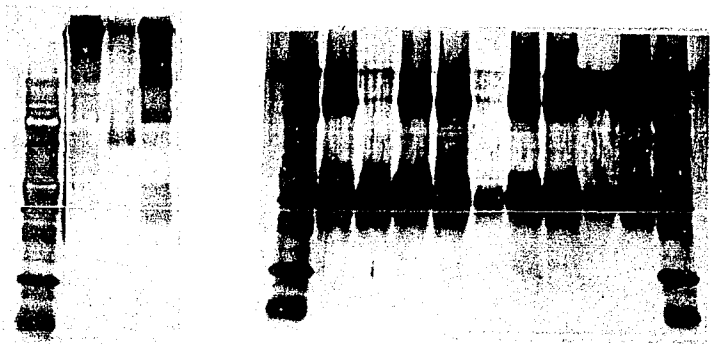


Figura 30 A. Gel de poliacrilamida-SDS al 10% en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, teñido con la técnica de nitrato de plata, en el cual se muestra la obtención de fragmentos Fab a partir de IgG puras específicas para la subunidad V. Carriles 1: complejo bc, intacto como marcador de pesos moleculares; 2: IgG puras (150 KDa); 3: fragmentos Fab (50 KDa) y 4: fragmentos Fc e IgG no digeridas (150 y 50 KDa respectivamente). B. Obtención de fragmentos Fab a partir de IgG específicas para las subunidades V, VI y suero preinmune realizado en las mismas condiciones que en A, y en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Carriles 1 y 11: complejo bc, intacto como marcador de pesos moleculares; 2, 5 y 8: IgG puras intactas (50 y 25 KDa); 3, 6 y 9: Fragmentos Fab (25 KDa) y 4, 7 y 10: Fragmentos Fc e IgG no digeridas (50 y 25 KDa).

de las IgGs. La diferencia es mostrada en los carriles 2 y 4, 5 y 7, 8 y 10, en los cuales se observaron tanto a las IgGs puras como a las no digeridas como dos bandas características de las cadenas pesadas y ligeras.

#### **11. Reacción antígeno-anticuerpo e inhibición de la actividad del complejo bc, delipidado en presencia de fragmentos Fab.**

La reacción antígeno-anticuerpo obtenida cuando se incubaron 20  $\mu\text{g}$  de complejo bc, en presencia de concentraciones crecientes de los fragmentos Fab específicos para las subunidades V y VI (**Figura 31 A**) fué prácticamente la misma que la obtenida utilizando los anticuerpos completos (**Figura 16**). En éste caso también, la reacción obtenida para los fragmentos Fab específicos contra la subunidad V fué mayor por tres ordenes de magnitud a la reacción obtenida por los fragmentos Fab específicos para la subunidad VI. Esta diferencia se visualizó a partir de concentraciones pequeñas de cada anticuerpo ( $2 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}$ ).

Los resultados de inhibición de la actividad del complejo se muestran en la **Figura 31 B**, en la cual utilizando concentraciones molares equivalentes a las de IgGs completas, se pudo observar un decremento drástico en ésta cuando el complejo fué incubado con concentraciones conocidas de los fragmentos Fab específicos contra la subunidad V. Aún utilizando concentraciones muy pequeñas de estos fragmentos ( $1 \times 10^{-9}$   $\mu\text{g}$ ) la actividad residual obtenida fué del 40 %, obteniendo una actividad residual final a 100  $\mu\text{g}$  de fragmentos Fab del 11 %. A diferencia de éstos resultados, los obtenidos para los fragmentos Fab específicos contra la subunidad VI no mostraron

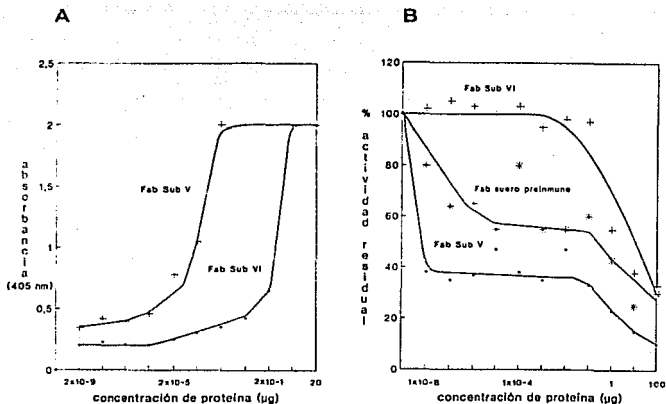


Figura 31 A. Reacción antígeno-anticuerpo del complejo bc, en presencia de concentraciones crecientes de fragmentos Fab específicos para las subunidades V (proteína hierro-azufre) y VI evaluada por medio de la prueba de ELISA y B. Porcentaje de la actividad residual del complejo delipidado medida en presencia de concentraciones crecientes de fragmentos Fab específicos contra las subunidades V (proteína hierro-azufre), VI y suero preinmune después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos. El 100 % de la actividad obtenida por los fragmentos Fab corresponde a 1.02, 0.7 y 0.8 μmoles de cit c reducido/min/mg de proteína respectivamente.

inhibición alguna a bajas concentraciones de los fragmentos sino hasta concentraciones del orden de  $1 \times 10^6 \mu\text{g}$ .

Los resultados obtenidos al incubar el complejo con los fragmentos Fab de suero preinmune curiosamente mostraron una inhibición de la actividad a concentraciones bajas de  $1 \times 10^2 \mu\text{g}$ , en la cual se obtuvo una actividad residual del 65 % y no únicamente a concentraciones altas de los fragmentos como se mostró en los resultados obtenidos cuando se utilizaron IgGs de suero preinmune sin digerir.

## **12. Modelo teórico sobre la participación de la subunidad VIII en la actividad del complejo bc, mitocondrial de corazón de bovino.**

Uno de los objetivos planteados en éste trabajo fué la de estudiar la participación de la subunidad VIII en la actividad del complejo bc, ya que, como ha sido anteriormente propuesto en la literatura, parece ser que ésta subunidad podría producir un cambio conformacional en el citocromo  $c_1$  tal que le permitiera interactuar con el citocromo  $c$  soluble durante la transferencia de electrones en el espacio intermembranal de la mitocondria (Kim y King, 1983 y Kim y col, 1983).

En primera instancia, se produce un modelo teórico sobre cómo es que ésta subunidad estaría interactuando con las subunidades vecinas para llevar a cabo la transferencia de los electrones. Este modelo fué construido basado en las características de estructura secundaria de las subunidades VIII, X y citocromo  $c_1$  obtenidas a partir de la secuencia primaria sometida a diversos algoritmos sobre predicción de estructuras secundarias ( $\alpha$ -helices,  $\beta$ -plegadas y torciones) (Chou y Fasman, 1978 y Garnier y col,

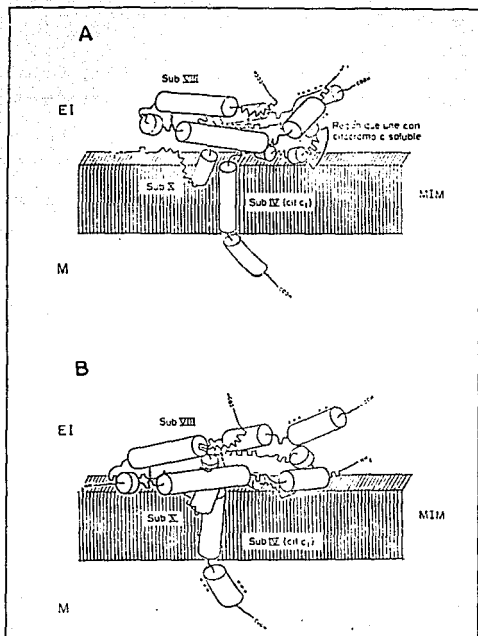
1978), perfiles de hidropatía (Kyte y Doolittle, 1982), perfiles de hidrofiliidad (Hopp y Woods, 1981), predicción de hélices asociadas a la membrana (Rao y Argos, 1982), análisis de regiones flexibles y predicción de segmentos de la secuencia que se expanden en la membrana (Klein y col, 1985 y Eisenberg y col, 1984).

En la Figura 32, se muestra un esquema obtenido a partir de los análisis antes mencionados donde presentamos este modelo original. La estructura secundaria para la subunidad IV ha sido parcialmente esquematizada. El modelo teórico propone dos estados conformacionales para las tres subunidades ubicadas en el espacio intermembranal de la mitocondria.

El primer estado se refiere a la estructura que tomarían éstas subunidades en ausencia del citocromo c soluble, en el cual necesariamente, se llevarían a cabo interacciones entre las subunidades X-VIII, IV-X y IV-VIII favorecidas por interacciones entre cargas opuestas de cada subunidad y regiones flexibles de las mismas.

El segundo estado se refiere a la estructura conformacional que tomarían estas subunidades durante la transferencia de electrones en presencia del citocromo c soluble. En éste caso, las interacciones esperadas entre cada subunidad serían: cit c-VIII, cit c-X, cit c-IV, IV-X, IV-VIII y VIII-X en las cuales se favorecería el cambio conformacional del citocromo c, dado por la subunidad VIII para la interacción con el citocromo c soluble.

De acuerdo a lo anterior, el modelo propuesto hablaría de una estructura en forma de "tijera" (dada por las subunidades VIII, X y cit c,) la cual estaría abierta únicamente en presencia del citocromo c soluble y cerrada en ausencia de éste. El enfoque experimental escogido para poder aportar evidencia para dicho modelo fué el de purificar



**Figura 32.** Modelo teórico de "tijera" que muestra las conformaciones estructurales adquiridas por las subunidades IV (cit c<sub>1</sub>), VIII (proteína de unión) y X del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial durante la transferencia de electrones en la membrana interna mitocondrial deducida a partir de diversos algoritmos. La estructura secundaria para el cit c<sub>1</sub> ha sido parcialmente esquematizada. **A.** Conformación cerrada en ausencia del citocromo c soluble y **B.** Conformación abierta en presencia del citocromo c soluble. EI: espacio intermembranal; M: matriz respectivamente; MIM: membrana interna mitocondrial; + y -: cargas positivas y negativas en la secuencia de aminoácidos de cada subunidad,  $\square$ :  $\alpha$ -hélice;  $\text{---}$ :  $\beta$ -plegada y  $\text{---}$ : vueltas o torciones.

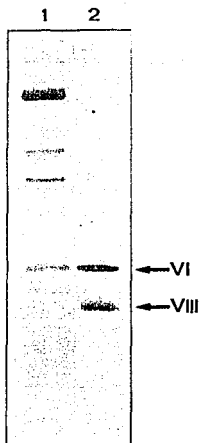
la subunidad VIII, producir anticuerpos contra ella y estudiar la formación de productos de entrecruzamiento con EDC por medio de inmunorélicas tipo Western.

### **13. Purificación de la subunidad VIII a partir del complejo bc, mitocondrial.**

La subunidad VIII fué purificada a partir de una preparación de complejo bc, puro y de una preparación que contenía únicamente a las subunidades VI y VIII (Figura 33). Dicha preparación fué obtenida a partir de la técnica descrita por García-Ponce (1992).

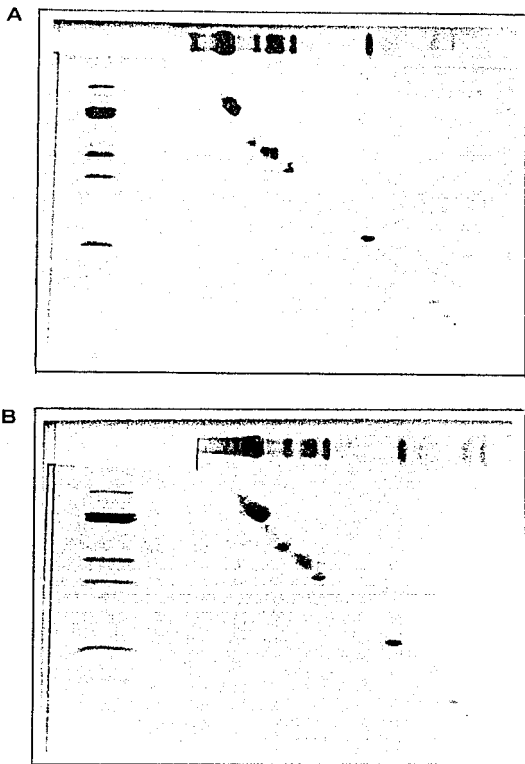
El sistema de geles utilizado para la purificación requirió de un amortiguador catódico con azul G de Coomasie (25 mg/l) y de un tiempo de corrida de aproximadamente 72 h, por lo que se probó si éstas condiciones experimentales no daban como resultado cambios en la movilidad electroforética de las subunidades del complejo. Para ello se corrieron electroforesis de doble dimensión en geles de poliacrilamida al 16 % con 30 µg del complejo bc, puro en las mismas condiciones de trabajo en presencia y en ausencia de β-mercapto etanol. Los resultados obtenidos de éste experimento se muestran en las Figuras 34 A y B en los cuales se observó que no existe ninguna variación en la movilidad electroforética de estas subunidades.

De acuerdo a lo anterior, se obtuvo una preparación de la subunidad VIII pura visualizada en un gel de poliacrilamida al 16 % teñido con la técnica de nitrato de plata (Oakley y col, 1980 y Wray y col, 1981) (Figura 35).



**Figura 33.** Gel de poliacrilamida-SDS al 16 % teñido con azul G de Coomassie en el cual se muestra una preparación que contiene a las subunidades VI y VIII puras. Carril 1: complejo bc, puro como marcador de pesos moleculares y 2: subunidades VI y VIII.





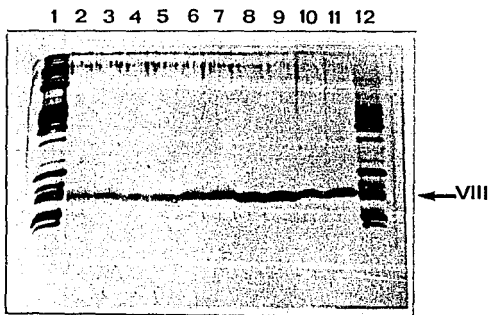
**Figura 34 A.** Patrón electroforético del complejo bc, obtenido a partir de una electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS al 16 % en presencia y **B.** en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. La primera dimensión fué llevada a cabo con un amortiguador catódico en presencia de azul G de Coomassie.

#### **14. Obtención de anticuerpos contra la subunidad VIII pura.**

Con el fin de obtener anticuerpos específicos contra ésta subunidad, se inmunizaron conejos en las siguientes condiciones:

- 1) Con la subunidad VIII pura sola
- 2) Con la subunidad VIII pura acoplada a albúmina como acarreador antigénico utilizando dos métodos para llevar a cabo dicho acoplamiento: a) con glutaraldehído y b) con carbodimida.
- 3) Con la subunidad VIII pura acoplada a hemocianina en las mismas condiciones que en el punto 2).
- 4) Con el péptido sintético obtenido a partir de la subunidad VIII acoplado a los mismos acarreadores antigénicos (albúmina y/o hemocianina) en las mismas condiciones que en el punto 2).

Los resultados obtenidos al analizar cada uno de los sueros resultantes mostraron reacción inespecífica contra las dos subunidades de mayor peso molecular (las subunidades estructurales I y II) o contra la subunidad V (proteína hierro-azufre) y ninguna reacción contra la subunidad VIII. De acuerdo con lo anterior, estos resultados confirman la sugerencia de que ésta subunidad es muy poco antigénica, ya que a la fecha ningún grupo de investigación ha reportado la obtención de anticuerpos específicos contra ella.



**Figura 35.** Subunidad VIII pura obtenida a partir del complejo bc, mitocondrial mostrada en un gel de poliacrilamida-SDS al 16 % teñido con la técnica de nitrato de plata. Carril 1 y 12: complejo bc, intacto como marcador de pesos moleculares; 2-11: subunidad VIII pura.

## **V. DISCUSION.**

Como se ha mencionado, este trabajo se centró en estudiar, mediante una estrategia inmunoquímica, cuál es la participación de algunas de las subunidades en la actividad del complejo bc<sub>1</sub>.

De acuerdo a lo anterior, inicialmente se plantearon dos estrategias metodológicas por medio de las cuales es posible estudiar la participación de una subunidad específica en la actividad de una proteína oligomérica. Estas dos estrategias fueron: 1) el aislamiento de una subunidad del complejo y su posterior reconstitución y 2) bloqueando la subunidad integrada al complejo por la interacción con anticuerpos específicos. En éste trabajo hemos seguido la segunda estrategia para tratar de resolver las preguntas formuladas al inicio.

### **1. Importancia de los fosfolípidos en la estructura de las proteínas y en la Interacción antígeno-anticuerpo.**

Existen estudios de cómo es que se lleva a cabo la interacción lípido-proteína en complejos membranales mitocondriales como la ubiquinol citocromo c óxido-reductasa, la succinato citocromo c óxido-reductasa y la citocromo c oxidasa así como el estudio sobre la participación de los fosfolípidos en las conformaciones estructurales adquiridas por estas proteínas oligoméricas (Yu y Yu, 1980 y Schägger y col, 1990).

La interacción lípido-proteína de gran importancia en proteínas integrales de membrana y en complejos oligoméricos integrales, ya que se ha podido demostrar que si se eliminan a los fosfolípidos (en el caso del complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino) por medio de tratamientos con detergentes como el Tritón, la estructura del complejo se modifica de tal forma que su actividad disminuye significativamente (Schägger y col, 1990).

De acuerdo con esto, se deriva la importancia de haber obtenido preparaciones del complejo bc<sub>1</sub> puro carente de fosfolípidos (delipidado) por medio de un tratamiento con sales de amonio. El incremento en el número de precipitaciones con dichas sales decrementó drásticamente la actividad del complejo como ya había sido observado en otros trabajos (Yu y Yu, 1980). Sin embargo, con este tratamiento se facilitó la interacción con los anticuerpos específicos.

Cualquier tratamiento para llevar a cabo la eliminación de los fosfolípidos (por lo menos en el caso del complejo bc<sub>1</sub>) produce una disminución moderada o drástica en la actividad del complejo dependiendo del método utilizado. Parte de este decremento se debe a un cambio producido en las subunidades con centros redox reflejado en modificaciones en los números de recambio o en la reducción "temprana" del citocromo c<sub>1</sub> (Yu y Yu, 1980 y Schägger y col, 1990).

La relación molar entre los citocromos b y c<sub>1</sub> del complejo III mitocondrial es de dos citocromos b por un citocromo c<sub>1</sub> en el monómero de complejo en condiciones nativas.

Tomando en cuenta los trabajos reportados anteriormente, podemos hablar de que nuestra preparación no mostró cambios importantes en la composición molar de los

citocromos b y c, ya que los análisis espectroscópicos mostraron una relación de 2:1 como en el complejo intacto. Cuando se lleva a cabo la purificación de alguna de las subunidades como la V (proteína hierro-azufre), por medio de columnas hidrofóbicas (de fenil sefarosa) como las realizadas por el grupo de Shimomura y col (1984), se obtiene la pérdida de uno de los centros hémicos del citocromo b por razones hasta ahora desconocidas, por lo que el obtener una preparación del complejo carente de fosfolípidos y con un contenido hémico normal nos proporcionó un sistema óptimo para la realización posterior de las actividades específicas en presencia y en ausencia de los fosfolípidos.

La recuperación en la actividad del complejo bc<sub>1</sub> delipidado depende de las condiciones en las cuales se haya llevado a cabo el tratamiento. Si la delipidación fué realizada por la acción de detergentes, la recuperación será mayor que en el caso de haber incubado al complejo intacto en presencia de fosfolipasas (en este caso la fosfolipasa A<sub>2</sub>). Se ha comprobado que esto se debe principalmente a que la cantidad de fosfolípidos eliminados en el tratamiento con fosfolipasas es total (Schägger y col, 1990). Debido a esto, realizamos los experimentos posteriores con el complejo delipidado por el tratamiento con sales de amonio.

En ambos casos, la recuperación en la actividad se produjo al poner en contacto al complejo delipidado con una mezcla de fosfolípidos [en nuestro caso de fosfatidilcolina, etanolamina y cardiolipina en la misma proporción que se encuentran en la membrana interna mitocondrial (Capaldi, 1982)] en la cual teóricamente se restablecen las interacciones lípido-proteína para obtener una conformación estructural muy parecida a

la que tenía el complejo intacto. Las actividades del complejo delipidado obtenidas después de la reconstitución con los fosfolípidos nunca llegó a ser la misma del complejo intacto, sin embargo, estos resultados están de acuerdo con los anteriormente reportados (Shägger y col, 1990).

Existen datos que proponen un restablecimiento de la estructura secundaria de una proteína integral carente de fosfolípidos evaluada por su actividad específica. Algunas características que deben tomarse en cuenta, son: 1) el tipo de fosfolípidos empleados para la reconstitución de cada complejo oligomérico (en este caso el complejo bc<sub>1</sub>), ya que se ha podido demostrar que las cabezas polares (con carga positiva) de los fosfolípidos son parte esencial en la reactivación del complejo y 2) los sitios de alta y baja afinidad que se encuentran en cada proteína (en el caso de que sea integral de membrana o completamente hidrofílica) ya que si no existen sitios preferenciales de unión en las regiones hidrofóbicas de la proteína, la afinidad de unión de los fosfolípidos será baja (Schägger, 1990).

Los datos anteriores pueden explicar porque con nuestra preparación, solamente se obtuvo una reactivación del 25 % de la actividad inicial. Probablemente los sitios preferenciales para la unión de los fosfolípidos en cada subunidad no se encontraban expuestos de la misma manera que en el complejo intacto, esto provocado por una desnaturalización parcial de la proteína por los tratamientos con las sales de amonio. Además hay que tomar en cuenta que nuestra preparación es un complejo oligomérico, el cual posee subunidades hidrofóbicas e hidrofílicas y que las diferencias entre una conformación sin lípidos y una normal pueden ser numerosas.

Es importante mencionar que las características de la mezcla de fosfolípidos utilizada para el complejo bc<sub>1</sub> es completamente diferente a la que se requeriría para reconstituir la actividad en otros complejos mitocondriales como el de la citocromo oxidasa, esto puede deberse a las diferentes características en la hidrofobicidad de los donadores de electrones específicos para cada complejo durante la transferencia de electrones, en estos casos el ubihidroquinol y el citocromo c respectivamente (Brandt y col, 1989).

Como ya se mencionó anteriormente, la interacción antígeno-anticuerpo se lleva a cabo por medio de un contacto directo del anticuerpo específico con la proteína o la subunidad en cuestión. En este trabajo utilizamos anticuerpos específicos tanto para subunidades que son integrales de la membrana como el citocromo b, como para subunidades que son preponderantemente hidrofílicas como las subunidades estructurales I y II.

De acuerdo a esto, los fosfolípidos con los cuales se obtiene al complejo bc<sub>1</sub> puro bloquearon la interacción de los anticuerpos específicos para la subunidad III (o citocromo b), esto resulta lógico, ya que ésta es una subunidad integral de membrana, sin embargo, al incubar al complejo intacto (sin delipidar) con anticuerpos específicos contra las subunidades hidrofílicas (I y II) se obtuvieron también resultados negativos a pesar de que los anticuerpos mostraron una alta reacción en inmunotransferencias tipo Western. Solo al llevar a cabo la delipidación del complejo puro se observó un efecto con los seis anticuerpos probados.

La posible explicación para los datos discutidos anteriormente se refiere a cómo se llevan a cabo las interacciones lípido-proteínas, ya que se ha podido observar en



diversos sistemas que las interacciones entre las superficies polares expuestas de los fosfolípidos así como las interacciones estereo específicas con la proteína juegan un papel muy importante. Además se ha podido observar en proteínas membranales (con los centros de reacción cristalizados provenientes de bacterias fotosintéticas) que la micela lípido-detergente rodea completamente las zonas hidrofóbicas de las proteínas (Roth y col, 1989 y 1991) lo cual justifica la necesidad de llevar a cabo la delipidación del complejo para facilitar la interacción con los anticuerpos específicos contra el citocromo b.

Sin embargo, para el caso de las subunidades hidrofílicas I y II, resulta poco claro la necesidad de llevar a cabo la delipidación del complejo para que se establezca la interacción antígeno-anticuerpo. Los trabajos reportados utilizando muestras de IgG puras cristalizadas y fragmentos Fab derivados de estos, muestran que la interacción con el antígeno se lleva a cabo en zonas específicas en las cuales existen residuos de aminoácidos cargados o aromáticos (Rini y col, 1992). Si se lleva a cabo el análisis de la secuencia de aminoácidos reportada para las subunidades I y II de complejo bc<sub>1</sub> de corazón de bovino (Gencic y col, 1991) se puede observar que existe una zona en la cual la presencia de este tipo de aminoácidos se encuentra con mayor frecuencia (a partir del aminoácido 80 al 250) y tomando en cuenta que es la zona central de la secuencia, se puede argumentar que muy probablemente esta parte está dirigida hacia el interior del centro del complejo, muy cercana o directamente relacionada a la estructura del citocromo b. Por lo anterior, pensamos que la presencia de algunos fosfolípidos que se encuentren cercanos a esta zona pueden interferir en la interacción

de los anticuerpos con la subunidad.

## **2. Reacción antígeno-anticuerpo inespecífica obtenida con sueros preinmunes.**

La reacción antígeno-anticuerpo fué evaluada por la técnica de ELISA y por la obtención de actividades residuales incubando al complejo delipidado en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos generados contra las diferentes subunidades. Los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando la técnica de ELISA, muestran una reacción positiva a concentraciones de aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  de anticuerpos (0.7 molas de anticuerpo/mol de  $\text{bc}_1$ ).

En lo que se refiere a la inhibición de la actividad del complejo utilizando estos mismos sueros, se observó que la reacción inespecífica fué evidente a concentraciones iguales o mayores a 100  $\mu\text{g}$  del anticuerpo (3.3 molas de anticuerpo/mol de  $\text{bc}_1$ ), por ello es válido decir que todas las inhibiciones obtenidas en este rango de concentración son inespecíficas.

Sin embargo, los datos encontrados en este trabajo, no están de acuerdo con lo obtenidos por otros grupos de investigación, ya que en nuestro caso utilizando 100  $\mu\text{g}$  de suero preinmune y 50  $\mu\text{g}$  de complejo  $\text{bc}$ , puro se obtiene una reacción de inhibición de la actividad del 60 % que va de acuerdo con los datos obtenidos por la técnica de ELISA; esto contrasta con los resultados obtenidos por grupos como el de Haley y col (1986) en los cuales realizan también incubaciones con 15  $\mu\text{g}$  del complejo  $\text{bc}$ , utilizando concentraciones crecientes del suero preinmune hasta de 2 mg (222.2 molas de

anticuerpo/mol de bc<sub>1</sub>) sin obtener una reacción inespecífica dada por efectos estéricos. De igual forma estos resultados se presentan en los trabajos realizados por el grupo de Usui y col (1991) en los cuales se midió la inhibición de la actividad con 40 µg del complejo bc<sub>1</sub> utilizando concentraciones hasta de 10 µg (0.4 molas de anticuerpo/mol de bc<sub>1</sub>) de suero preimmune sin obtener una reacción inespecífica. Esto resulta un tanto contradictorio con sus propios resultados, ya que cuando miden la reacción antígeno-anticuerpo por la técnica de ELISA, con solo 5 µg de suero preimmune (0.2 molas de anticuerpo/mol de bc<sub>1</sub>) encuentran una reacción positiva creciente, por lo que sería lógico encontrar en sus pruebas de actividad una reacción positiva de inhibición dada por efecto estérico con éste suero.

Los resultados obtenidos en éste trabajo fueron realizados siguiendo las mismas relaciones de concentración de anticuerpo/antígeno que en los trabajos anteriormente citados, por lo que la comparación con dichos trabajos es válida.

### **3. Topología del complejo bc<sub>1</sub>.**

Existen trabajos realizados por diferentes grupos de investigación en los cuales se han utilizado anticuerpos específicos contra el complejo bc<sub>1</sub> total y análogos de lípidos fotorreactivos con los cuales se ha podido evidenciar cuál es la ubicación, en la membrana interna mitocondrial, de las diferentes subunidades que integran a este complejo (Nelson y Mendel-Hartvig, 1977 y Gutweniger y col, 1981).

Analizando las inhibiciones residuales obtenidas con los anticuerpos específicos para

las subunidades estructurales de alto peso molecular, las subunidades I y II, se pudo observar que a bajas concentraciones de los anticuerpos específicos se obtenía una inhibición residual en un rango de aproximadamente el 60 % y esta decrecía al 40 % cuando se utilizaban mayores concentraciones del anticuerpo (de 1 a 10  $\mu\text{g}$ ), lo cual sugiere la participación de dichas subunidades en la actividad del complejo.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados a la luz de trabajos anteriormente realizados utilizando tratamientos con papaína del complejo completo, en los cuales se ha podido observar que cuando la digestión con ésta enzima produce una proteólisis parcial de la subunidad II, se observa una supresión en la translocación de protones, sugiriendo algún papel de esta subunidad en la estabilización de las especies de semiquinonas (Lorusso y col, 1985). Existen también estudios en los cuales se ha sugerido la participación de estas dos subunidades en el procesamiento de proteínas de matriz como es el caso de la subunidad I (Schulte y col, 1989 y Weiss y col, 1990) y como parte fundamental en la estructura del complejo bc<sub>1</sub> para el caso de la subunidad II (Tzagoloff y col, 1986), por lo que los resultados de inhibición obtenidos en el presente trabajo podrían deberse a algún cambio estructural provocado por los anticuerpos que esté dando como resultado un efecto directo en la actividad específica del complejo.

En lo que se refiere a la inhibición obtenida por anticuerpos específicos contra el citocromo b o subunidad III, se observó que dichos anticuerpos produjeron la inhibición más evidente en la actividad específica del complejo aún a concentraciones muy bajas. Se han reportado varios trabajos con los cuales se ha evidenciado la importancia en la estabilidad de la estructura en proteínas integrales de membrana, como es el caso del

citocromo b, dada por la presencia de lípidos interactuando con las regiones más hidrofóbicas de la proteína (Schägger y col, 1990).

Por medio de predicciones de plegamiento se ha sugerido que los dos grupos hemo del citocromo b están ubicados en una especie de "sandwich" entre columnas helicoidales que corren a lo largo del plano de la membrana las cuales están asociadas a través de ligandos de histidina al hierro hémico (Wikstrom y Krab, 1986). Además, la función definida para el citocromo b radica en conservar al segundo electrón liberado durante la oxidación del ubiquinol para regresarlo a través del espacio intermembranal a la poza de quinonas en el centro  $Q_i$  (Rieske, 1986).

De acuerdo a estos datos, podemos pensar que:

1) El tratamiento con sales de amonio para llevar a cabo la delipidación del complejo afectó directamente a la estructura secundaria del citocromo b. Existen evidencias en las cuales se muestran este tipo de cambios por medio de variaciones en el espectro óptico y de resonancia paramagnética del electrón del citocromo b como resultado de la eliminación de lípidos en una preparación de succinato citocromo c-reductasa. Estas variaciones son restablecidas después de reconstituir con una mezcla de fosfolípidos (Salerno y col, 1986). Y ya que ésta es la única subunidad del complejo que está completamente integrada a la membrana, la ausencia de lípidos en la misma produjo cambios estructurales importantes que repercutieron en la actividad del complejo.

2) La interacción del anticuerpo específico contra esta subunidad produjo un cambio estructural sobre este citocromo, provocando que aún después de la reconstitución del complejo con la mezcla de fosfolípidos ésta subunidad ya no lleve a cabo el paso de los

electrones en su ruta normal.

Con lo que se refiere a la inhibición del complejo provocada por los anticuerpos específicos contra las subunidades IV y V, se observó que esta no fué tan dramática como la anterior, aún cuando son dos de las subunidades importantes para la actividad del complejo. La posible explicación a este hecho es discutida con base en la comparación realizada de las inhibiciones obtenidas con anticuerpos específicos para las subunidades que están orientadas hacia el lado de la matriz y del espacio intermembranal.

Como se observó en los resultados, los anticuerpos que produjeron una inhibición importante en la actividad del complejo fueron aquellos que estaban dirigidos contra las subunidades orientadas hacia la matriz mitocondrial (subunidades I, II y VI), lo cual *a priori* no se esperaba tomando en cuenta que la transferencia de electrones llevada a cabo por medio del ciclo Q, se realiza a través de las subunidades expuestas hacia el espacio intermembranal (subunidades IV y V).

Sin embargo, se ha reportado la existencia de dos centros importantes de unión para el ubiquinol: 1) el centro  $Q_o$  en el cual se une con la proteína hierro-azufre y 2) el centro  $Q_i$  asociado con el sitio de reducción de la ubiquinona (Rieske, 1986) y que los sitios catalíticos en ambos centros se derivan a partir de diversos genes ancestrales por medio de una evolución convergente (Gabellini y col, 1988). Estos dos centros están asociados directamente con la estructura del citocromo b, sin embargo el centro  $Q_i$  está orientado hacia el lado de la matriz mitocondrial, al igual que las subunidades I, II y VI.

También se ha encontrado que la región del citocromo b que está orientada hacia el

espacio intermembranal posee residuos de aminoácidos que han sido conservados en la evolución en proteínas de procariontes y mitocondriales, sin embargo, hay una divergencia sustancial con respecto al citocromo  $b_6$  de cloroplasto y el citocromo b de tripanosomas (Howell, 1989). A su vez, se ha comparado la secuencia de aminoácidos de esta subunidad en diversos organismos como bacterias fotosintéticas (*Rhodobacter capsulata*), trigo, espinaca, levaduras y ratón (Howell, 1989), encontrándose que la región de este citocromo que está expuesta hacia el espacio de la matriz mitocondrial se encuentra poco conservada.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la interacción obtenida entre los anticuerpos específicos para las subunidades ubicadas hacia la matriz producen cambios conformacionales irreversibles (como los observados con los antibióticos) en las subunidades vecinas, ya sea la subunidad VI o el citocromo b directamente, que sin duda están afectando al centro  $Q_e$ , por lo que las inhibiciones producidas con estos anticuerpos son mayores.

Por otra parte, los resultados obtenidos para la subunidad VI mostraron un 50 % de la inhibición de la actividad del complejo en presencia de su anticuerpo específico utilizando concentraciones bajas del mismo (del orden de 0.4  $\mu\text{g}$  del mismo, correspondiente a 14  $\mu\text{mol}$  de anticuerpo/mol de  $bc_1$ ), en comparación con las obtenidas, por ejemplo, con la subunidad II. También se ha propuesto que la subunidad VII de levadura (correspondiente a la subunidad VI en bovino) está involucrada en la reducción del citocromo b en el centro  $Q_e$  del complejo  $bc_1$  (Japa y col, 1987).

En concreto, proponemos que el sitio  $Q_c$ , compartido por el citocromo b, la proteína hierro-azufre, así como la presencia cercana del citocromo c<sub>1</sub>, es una estructura compacta y muy conservada, con grupos prostéticos que proporciona cierta rigidez a la parte proteica. Dichas subunidades son poco susceptibles a la acción de los anticuerpos mono-específicos. Por otra parte el sitio  $Q_c$ , compartido por el propio citocromo b, la subunidad VI y la cercanía de las subunidades I y II, es una región poco conservada y muy susceptible a cambios conformacionales inducidos por anticuerpos y muy dependiente de la presencia de fosfolípidos. Además, tomando en cuenta que los residuos más conservados en la secuencia de aminoácidos del citocromo b se encuentran en el lado donde se ubica el centro  $Q_c$  y no en el lado opuesto, resulta lógico pensar que las estructuras de estas subunidades (IV y V) sean más difíciles de modificar.

En lo que se refiere a las inhibiciones de la actividad producidas por los fragmentos Fab generados contra las subunidades V y VI se obtuvieron resultados contradictorios, ya que fragmentos Fab del suero preinmune inhibieron la actividad del complejo a concentraciones tan bajas de  $1 \times 10^{-6}$   $\mu$ g, cuando en otros trabajos donde se utilizan hasta 2 mg del mismo no se obtiene ninguna reacción.

La inhibición por estos fragmentos debe explorarse con mayor cuidado en el futuro, descartando la posibilidad de que pequeñas cantidades residuales de papaína sean las responsables de la inhibición observada.



#### 4. Topología de la región amino-terminal del citocromo b.

Diversos estudios se han llevado a cabo para elucidar cuál es la topología de todos los segmentos predichos para el citocromo b. Los primeros trabajos realizados mostraron que el citocromo b estaba constituido por 9 hélices transmembranales. Posteriormente se realizaron estudios en los cuales se propuso que la hélice IV no era transmembranal, sino que se encontraba fuera de la membrana orientada hacia el espacio intermembranal pero que conservaba interacciones lípido-proteína con las regiones vecinas del citocromo (Howell y Gilbert, 1988; Crots y col, 1987 y Di Rago y col, 1988).

El uso de fusiones génicas utilizando el citocromo b de *Rhodobacter sphaeroides*, permitió dar una evidencia más a este respecto proponiendo el modelo de ocho hélices transmembranales en el cual la región carboxilo-terminal se encuentra orientada hacia el lado de la matriz mitocondrial (Yun y col, 1991) y existen datos reportados en los cuales se ha comprobado que la homología en la región amino-terminal entre diversas especies (levadura, cloroplastos, bovino) es muy baja comparada a la región carboxilo-terminal (Widger y col, 1984).

Es importante mencionar que el complejo  $b_6f$  en cloroplastos [el cual posee un peso molecular de 23 KDa a diferencia del de mitocondrias (42 KDa)] muestra de 3 o 4 polipéptidos en geles de poliacrilamida incluyendo uno de 17 KDa cuya función es desconocida (Hurt y col, 1981). Casualmente ésta región posee una similitud del 30 % en su secuencia de aminoácidos comparada con la de la región carboxilo-terminal del citocromo b de mitocondrias. Por lo tanto se ha propuesto que el producto génico para

el citocromo b de 42 KDa es equivalente a dos distintos polipéptidos del cloroplasto de aproximadamente 23 y 17 KDa codificados en un gene bicistrónico del cloroplasto (Widger y col, 1984).

De acuerdo a estos datos se puede observar que a la fecha, no ha sido posible dar una evidencia la localización de la región amino-terminal del citocromo b, por lo que los estudios con anticuerpos específicos contra esta región son de gran importancia.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la inhibición de la actividad utilizando dichos anticuerpos fué de 50 %, lo cual es muy parecido a los resultados obtenidos con anticuerpos dirigidos hacia las subunidades expuestas hacia la matriz mitocondrial. Aún cuando existen estudios que proponen que la región amino-terminal ha sido poco conservada durante la evolución, nuestros datos sugieren que esta parte del citocromo b podría estar orientada hacia la matriz mitocondrial (al igual que el centro Q) dado que las respuestas de la inhibición mostradas con anticuerpos dirigidos contra la región carboxilo-terminal y la subunidad completa muestran también inhibiciones parecidas. Sin embargo, se requieren de más experimentos para explorar la topología de las regiones amino y carboxi-terminal, utilizando sistemas orientados como mitoplastos y partículas submitocondriales.

##### **5. Antigenicidad de la subunidad VIII o "proteína de unión" del complejo bc<sub>1</sub>.**

El interés por estudiar la participación de la subunidad VIII en la actividad del complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial radica en diversos trabajos publicados a partir de la década

pasada en los cuales se propone a esta subunidad como indispensable para la interacción entre los citocromos c, y c soluble durante la transferencia de electrones.

Los trabajos realizados a la fecha se refieren a su caracterización estructural y posible función, para lo cual se han utilizado estrategias bioquímicas como electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, digestión con proteasas como la tripsina y quimotripsina, espectroscopía de absorción de rayos X, tratamientos con ácido p-cloromercuriobenzóico así como la incubación con diferentes carbodimidias solubles en agua (Kim y col, 1981; Wakabayashi y col, 1982; Kim y col, 1988; Mukai y col, 1985; Gutweniger y col, 1983 y González-Halphen y col, 1988). Sin embargo, a la fecha no se ha podido determinar con claridad si realmente esta subunidad participa directamente en la actividad del complejo, por esta razón se decidió obtener anticuerpos específicos contra ésta subunidad y comprobar, incubando al complejo en presencia de estos, si se obtenía una disminución de la actividad específica del complejo que pudiera dar una prueba adicional que apoyara dichas aseveraciones.

Los resultados obtenidos después de inocular a la subunidad VIII pura y acoplada a diferentes acarreadores utilizando diferentes métodos, mostraron que los anticuerpos obtenidos reconocieron epítopes diferentes a los de la subunidad en cuestión aún cuando fué utilizado un péptido sintético diseñado de manera que los anticuerpos generados estuvieran dirigidos contra una de las regiones más hidrofílicas de la proteína (una región que contiene un segmento de 8 residuos de ac. glutámico cercanos a la región amino terminal (Wakabayashi y col, 1982)).

Estos resultados no fueron satisfactorios, sin embargo a la fecha ningún grupo de

investigación ha podido obtener anticuerpos específicos contra esta subunidad, por lo que los intentos realizados en este trabajo adquieren importancia. Por otra parte, de acuerdo a estos resultados, se ha podido comprobar que aún cuando exista una región altamente hidrofílica en la proteína no asegura que dicha región sea a su vez altamente antigénica. Concluimos que esta subunidad pequeña, de 9,175 Da, es una subunidad de muy pobre antigenicidad.

## **VI. CONCLUSIONES.**

**1)** Es necesario obtener una preparación de complejo bc<sub>1</sub> mitocondrial libre de fosfolípidos para asegurar que se lleve a cabo una interacción antígeno-anticuerpo inhibitoria.

**2)** La inhibición de la actividad obtenida por la utilización de altas concentraciones de anticuerpo produjo una reacción antígeno-anticuerpo inespecífica provocada por efecto estérico.

**3)** La inhibición de la actividad obtenida por los anticuerpos dirigidos contra las subunidades orientadas hacia la matriz mitocondrial (subunidades I, II y VI) sugiere que la reducción de la ubiquinona, necesaria para la transferencia de electrones y realizada en el centro Q<sub>o</sub>, puede ser alterada ya sea por cambios provocados directamente sobre el citocromo b o sobre subunidades vecinas a éste.

**4)** Los resultados obtenidos con anticuerpos específicos para la región amino-terminal del citocromo b sugieren que probablemente ésta región se encuentra orientada hacia el lado expuesto a la matriz mitocondrial.

## VII. PERSPECTIVAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, existen todavía una variedad de preguntas por contestar que implicarían la realización de diversos experimentos tomando en cuenta las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína. Algunos de estos experimentos podrían ser: 1) si se requiere una mezcla específica de fosfolípidos para reconstituir la actividad de un complejo característico tomando en cuenta los sustratos utilizados, entonces ¿qué tipo de interacciones están afectando la disponibilidad de la orientación de las quinonas u otros sustratos en un complejo carente de fosfolípidos? 2) ¿cómo se lleva a cabo la estabilización posterior de la ubisemiquinona o de la propia conformación de la proteína en presencia de los fosfolípidos? 3) y más específicamente ¿cuál de las etapas de la transferencia de electrones a partir del ubiquinol hasta el citocromo c es afectada por la eliminación de los fosfolípidos?

Por otra parte se derivan los experimentos que abrirían la posibilidad de responder a la pregunta de ¿cuál es la "ventaja", para un complejo oligomérico, de poseer subunidades supernumerarias además de las indispensables para su actividad? Los experimentos mostrados en este trabajo abren la posibilidad de realizar estudios inmunoquímicos con anticuerpos específicos (en forma de IgG puras o fragmentos Fab) contra las subunidades de bajo peso molecular (o péptidos sintéticos de éstas) como las subunidades IX, X y XI de las cuales todavía no se ha encontrado su función. Esto resultaría interesante ya que existen datos en los cuales se ha puesto en tela de juicio la importancia de la subunidad IX en la composición estructural de este complejo

(Schägger y col, 1990). De esta forma, se podría sugerir, por medio de la inactivación del complejo, si la participación de esta subunidad en el complejo tiene una participación funcional. Por último, otros de los experimentos a realizar que recientemente han adquirido gran importancia es el relacionado con la ubicación del extremo amino-terminal del citocromo b el cual a la fecha no se sabe con seguridad en que lado de la membrana interna mitocondrial está ubicado. Si se llevan a cabo experimentos con fragmentos Fab de los anticuerpos específicos que ya se han obtenido en nuestro laboratorio contra esta región, será posible dar una evidencia que apoye las teorías propuestas a este respecto en las cuales se ha sugerido que probablemente esta región se encuentre orientada en el lado de la matriz mitocondrial.

Experimentos que pueden apoyar a los resultados obtenidos en los anteriores podrían ser los realizados incubando al complejo bc<sub>1</sub> puro en sistemas de partículas submitocondriales y mitoplastos en presencia de los anticuerpos específicos para el citocromo b completo y las regiones amino y carboxilo terminal, ya que a la fecha se sabe que la región carboxilo terminal está orientada hacia la región de la matriz mitocondrial lo cual produciría reacción positiva con el complejo integrado en partículas submitocondriales únicamente.

Por otra parte, es importante mencionar que este tipo de estrategias inmunoquímicas son herramientas que junto con las bioquímicas, proporcionan argumentos válidos siempre y cuando se tomen en cuenta las condiciones óptimas para su realización.

## VIII. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Albracht, S.P.J., Dooijewaard, G., Leeuwerik, F.J. y Van Swol, B. 1977. **Biochim. Biophys. Acta.** 459:300-317
- 2) Anderson, W.M. y Fisher, R.R. 1978. **Arch. Biochem. Biophys.** 187:180-190
- 3) Anderson y col. 1981. **Nature.** 290:457-464
- 4) Argos, P., Rao, J.K.M. y Hargrave, P.A. 1982. **Eur. J. Biochem.** 128:565
- 5) Baum, H., Silman, H.I., Rieske, J.S. y Lipton, S.H. 1967. **J. Biol. Chem.** 242:4876-4887
- 6) Berry, E.A. y Trumpower, E.L. 1985. **J. Biol. Chem.** 260:2458-2467
- 7) Berry, E.A., Huang, L. y De Rose, V. 1991. **J. Biol. Chem.** 266:9064-9077
- 8) Berry, E.A., Huang, L., Earnest, Th. N. y Jap, B.K. 1992. **J. Mol. Biol.** 224:1161-1166
- 9) Bisson, R. y Montecucco, C. 1982. **FEBS Lett.** 150:49-53.
- 10) Brandt, U., Schägger, H. y Von Jagow, G. 1989. **Eur. J. Biochem.** 182: 705-711.
- 11) Broger, C., Nalecz, M. y Azzi, A. 1980. **Biochim. Biophys. Acta.** 592:519-527.
- 12) Capaldi, R.A. 1982. **Biochim. Biophys. Acta.** 694:291-306
- 13) Capaldi, R.A. 1991. **Curr. Biol.** 1:562-568
- 14) Crivellone, M.D., Wu, M. y Tzagoloff, A. 1988. **J. Biol. Chem.** 263:14323-14333
- 15) Crofts, A.R., Robinson, H., Andrews, K., Van Doren, S. y Berry, E. **Cytochrome Systems: Mol. Biol. Bioener.** Papa, S., Chance, B. y Emster, L. (Eds) (Plenum Press, N.Y., 1987) p.p. 617-624.
- 16) Chang-Hyon, Y., Van Doren, S.R., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1991. **J. Biol. Chem.** 266:10967-10973



- 17) Chomyn, A., Mariottini, P. Cleeter, M.W., Ragan, C.L., Matsunoyagi, A., Hatofi, Y., Doolittle, R.F. y Attardi, G. 1985. *Nature*. **314**:592-597
- 18) Chou y Fasman. 1986. *Annu. Rev. Biochem.* **47**:251-276.
- 19) Degli Esposti, M., Palmer, G. y Lenaz, G. 1989. *Eur. J. Biochem.* **182**:27-36.
- 20) Di Rago, J.P. y Colson, A.M. 1988. *J. Biol. Chem.* **263**:12564-12570.
- 21) Dooijewaard, G., DeBruin, G.J.M., Van Dijk, P.J. y Slater, E.C. 1978. *Biochim. Biophys. Acta.* **501**:458-469
- 22) Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R.J. 1984. *J. Mol. Biol.* **179**:125-142
- 23) Engel, W.D., Michalsky, C. y Von Jagow, G. 1983. *Eur. J. Biochem.* **132**:359-402
- 24) Gabellini, H. 1988. *J. Bioenerg. Biomem.* **20**:59-83.
- 25) García-Ponce, B. 1992. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 98 p.
- 25) Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B. 1978. *J. Mol. Biol.* **120**:97-120
- 27) Gencic, S., Schägger, H. y Von Jagow, G. 1991. *J. Biochem.* **199**:123-131.
- 28) González-Halphen, D., Lindorfer, M.A. y Capaldí, R.A. 1988. *Biochem.* **27**:7021-7030
- 29) González-Halphen, D., Vazquez-Acevedo, M. y García-Ponce, B. 1991. *J. Biol. Chem.* **266**:3870-3876
- 30) Gutweniger, H., Bisson, R. y Montecucco, C. 1981. *J. Biol. Chem.* **256**:11132-11136
- 31) Gutweniger, H., Grassi, C. y Bisson, R. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **116**:272-283.
- 32) Hackenberg, H. y Klingenberg, M. 1980. *Biochem.* **19**:548-555
- 33) Haley, P.E., Yu, L., Dong, J., Keyser, G.C., Sanborn, M.R. y Yu, Ch. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**:14593-14599
- 34) Harl, F.V., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. y Neupert, W. 1986. *Cell.* **47**:93-9-

- 35) Hateli y col. 1962. *J. Biol. Chem.* 237:1676-1680
- 36) Hateli, Y. 1985. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1015-1069
- 37) Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. y Lockav, W. 1983. *Biochim. Biophys. Acta.* 762:97-133
- 38) Hawakes, R. y col. 1982. *Anal. Biochem.* 119:142-147
- 39) Hoop, T.P. y Woods, K.R. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3824-3828.
- 40) Howell, N. 1989. *J. Mol. Evol.* 29:157-169.
- 41) Howell, N. y Gilbert, K. 1988. *J. Mol. Biol.* 203:607-618.
- 42) Huang, J., Struck, F., Matzinger, D.F. y Levings, Ch.S. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10716-10720.
- 43) Japa, S., Zhu, Q. y Beattie, D.S. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:5441-5444.
- 44) Karlsson, B., Hovmöller, S., Weiss, H. y Leonard, K. 1983 *J. Mol. Biol.* 165:287-302
- 45) Kim, Ch.H. y King, T.E. 1981. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 101:607-614
- 46) Kim, Ch.H. y King, T.E. 1983. *J. Biol. Chem.* 258:13543-13551
- 47) Kim, Ch.H., Balny, C. y King, T.E. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:8103-8108
- 48) Kim, Ch.H., Yencha, A.J., Bunker, G., Zhang, G., Chance, B. y King, T.E. 1989. *Biochem.* 28:1439-1441
- 49) Klein, P., Kanehisa, M. y DeLisi, C. 1985. *Biochim. Biophys. Acta.* 815:468-476
- 50) Konigsberg, W.H. y Henderson, L. 1983. *Methods. Enzymol.* 91:254-259
- 51) Kubota, T., Kawamoto, M., Fukuyama, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, Sh. y Matsubara, H. 1991. *J. Mol. Biol.* 221:379-382
- 52) Kubota, T., Yoshikawa, Sh. y Matsubara, H. 1992. *J. Biochem.* 111: 91-98
- 53) Kyte, J. y Doolittle, R.F. 1982. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.

- 54) Laemmli, U.K. 1970. **Nature**. 227:680-685.
- 55) Leonard, K., Wingfield, P., Arad, T. y Weiss, H. 1981. **J. Mol. Biol.** 149:259-274
- 56) Link, T.A., Shägger, H. y Von Jagow, G. 1986. **FEBS Lett.** 204:9
- 57) Link, T.A., Schägger, H. y Von Jagow, G. 1987. **Mol. Biol. Bioenerg.**
- 58) Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. y Trumppower, B.L. 1987. **Biochim. Biophys. Acta.** 891:227-241.
- 59) Lorusso, M., Gatti, D., Marzo, M. y Papa, S. 1985. **FEBS.** 182:370-374.
- 60) Löw, H. y Vallin, I. 1963. **Biochem. Biophys. Acta.** 69:361-374
- 61) Markwell, M.A.K., Ijaas, S.M., Breber, L.L. y Toldbert, N.E. 1978. **Anal. Biochem.** 87:206-210.
- 62) Mitchell, P. 1967. **FEBS lett.** 56:1-6
- 63) Mukai, K., Miyasaki, F., Wakabayashi, S., Kuramitsu, S. y Matsubara, H. 1985. **J. Biochem.** 98:1417-1425
- 64) Nelson, B. y Mendel-Hartvig, I. 1977. **Eur. J. Biochem.** 80:267-274
- 65) Oakley, B.R., Kirsh, D.R. y Morris, N.R. 1980. **Anal. Biochem.** 105:361-363
- 66) Oudshoorn, P., Van Steeg, H., Swinkels, B.W., Schoppink, P. y Grivell, L.A. 1987. **Eur. J. Biochem.** 163:97-103
- 67) Pfanner, N. y Neupert, W. 1990. **Annu. Rev. Biochem.** 59:331-353
- 68) Rieske, J.S. 1967. **Methods. Enzymol.** 10:239-245
- 69) Rieske, J.S. 1986. **J. Bioenerg. Biomem.** 18:235-257.
- 70) Rini, J.M., Schulze-Gahmen, U. y Wilson, I.A. 1992. **Science.** 255:959-965.
- 71) Robinson, N.C. y Capaldi, R.A. 1977. **Biochem.** 16:375-381
- 72) Roise, D. y Schatz, G. 1988. **J. Biol. Chem.** 263:4509-4511
- 73) Roise, D., Theiler, F., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richears, J.H., Allison, D.S. y Schatz, G. 1988. **EMBO J.** 7:649-653

- 74) Roth, M., Lewit-Bentley, A., Michel, H., Deisinhofer, J., Huber, R. y Oesterhelt, D. 1989. *Nature*. **340**:659-662.
- 75) Roth, M., Arnoux, B., Ducruix, A. y Reiss-Husson, F. 1991. *Biochem.* **30**:9403-9413.
- 76) Saraste, M. 1984. *FEBS Lett.* **166**:367
- 77) Salemo, J.C., Yoshida, S. y King, T.E. 1986. *J. Biol. Chem.* **201**:5480-5486.
- 78) Schägger, H. y Von Jagow, G. 1983. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**:307-311
- 79) Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. y Von Jagow, G. 1985. *FEBS Lett.* **190**:89-94
- 80) Schägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. y Von Jagow, G. 1986. *Methods Enzymol.* **126**:224-237.
- 81) Schägger, H. y Von Jagow, G. 1987. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.
- 82) Schägger, H., Aquila, H. y Von Jagow, G. 1988. *Anal. Biochem.* **173**: 201-205
- 83) Schägger, H., Hagen, T., Roth, B., Brandt, U., Link, T.A. y Von Jagow, G. 1990. *Eur. J. Biochem.* **190**:123-130.
- 84) Shimomura, Y., Nishikimi, M. y Ozawa, T. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**:14059-14063
- 85) Schmitt, M.E. y Trumpower, B.L. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**:17005-17011.
- 86) Schult, V., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W. y Weiss, H. 1989. *Nature*. **339**:147-149
- 87) Sidhu, A. y Beattie, D.S. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**:7879-7886
- 88) Szewczyk, B y Summers, D.F. 1988. *Anal. Biochem.* **168**:48-53
- 89) Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H. y Neupert, W. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**: 10364-10371
- 90) Towbin, H. y col. 1979. *Proc. Natl. Acad. Scie.* **76**:4350-4354
- 91) Trumpower, B.L. y Edwards, C.A. 1979. *J. Biol. Chem.* **254**:8697-8706

- 92) Trumpower, B.L. 1981. *Biochim. Biophys. Acta.* **639**:129-155.
- 93) Trumpower, B.L. 1990. *J. Biol. Chem.* **265**:11409-11412
- 94) Tzagoloff, A., Wu, M. y Crivelone, M. 1986. *J. Biol. Chem.* **261**:17163-17169
- 95) Usui, Sh., Yu, L., Harmon, J. y Yu, Ch. 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**:109-117
- 96) Von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Graf, P., Ohnishi, T. y Trumpower, B.L. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**:6318-6326
- 97) Von Jagow, G. y Ohnishi, T. 1985. *FEBS Lett.* **185**:311-315
- 98) Von Jagow, G. y Link, T.A. 1986. *Methods Enzymol.* **126**:253-271
- 99) Wakabayashi, S., Takeda, H., Matsubara, H., Kim, Ch.H. y King, T.E. 1982. *J. Biochem.* **91**:2077-2085
- 100) Weiss, H., Hovmöller, S. y Leonard, K. 1983. *Methods Enzymol.* **126**:191-200
- 101) Weiss, H. y Leonard, K. 1987. Structure and Function of Mitochondrial Ubiquinol: Cytochrome c Reductase and NADH: Ubiquinone Reductase. *Chemica Scripta.* **27B**, 73-81. En: Rynstrom, J. (1987). *Membrane Proteins: Structure, Function, Assembly.* Proceedings of the Sixty-sixth Nobel symposium held at Alfred Nobel's Bjorkborn, Karskoga Sweden, 1-5 September, 1987. Cambridge university Press. N:Y: 250 p.p.
- 102) Weiss, H., Leonard, K. y Neupert, W. 1990. *Elsevier Science Publishers.* **178-180**
- 103) Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. y Trebst, A. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:674
- 104) Wikström, M. y Krab, K. 1986. *J. Bioenerg. Biomem.* **18**:181-193.
- 105) Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. y Hancock, R. 1981. *Anal. Biochem.* **118**:197-203
- 106) Yagi, T. 1986. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**:302-311
- 107) Yu, L., Yu, C.A. y King, T.E. 1973. *Biochem.* **12**:540-546
- 108) Yu, Ch. y Yu, L. 1980. *Biochem.* **19**:5715-5720

- 109) Yue, W., Zou, Y., Yu, L. y Yu, Ch. 1991. **Biochem.** 30:2303-2306
- 110) Yun, Ch., Van Doren, S.R., Crofts, A.R. y Gennis, R.B. 1991. **J. Biol. Chem.** 266:10967-10973.
- 111) Zelesna, B., Richards, E.M., Tang, W., Lu, D., Sumners, C. y Raizada, M.K. 1992. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 183:781-788.